



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

Ensaio de vacina de rebanho contra agentes de metrite numa exploração bovina
leiteira

Gonçalo Moreira da Cunha Lamas

ORIENTADOR

Dr. José Inácio Alfaça

CO-ORIENTADOR

Doutor José Ricardo Bexiga

2016

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

Ensaio de vacina de rebanho contra agentes de metrite numa exploração bovina
leiteira

Gonçalo Moreira da Cunha Lamas

ORIENTADOR

Dr. José Inácio Alfaça

CO-ORIENTADOR

Doutor José Ricardo Bexiga

2016

LISBOA

Agradecimentos

Ao Dr. José Alface, o meu orientador, não só por ter enriquecido tanto o meu estágio na Fonte de Leite com os conhecimentos que me transmitiu e desafios que me fez, mas também por toda a disponibilidade mostrada e apoio e sugestões dadas ao longo do processo de realização do estudo e pelo seu tão importante e valioso contributo na parte experimental que não poderia ter sido realizada sem a sua ajuda.

Aos engenheiros zootécnicos da Fonte Leite, o João Diogo, a Susana e o Jorge, por todos os ensinamentos. A eles e a todos os outros trabalhadores da exploração, um grande obrigado por me terem recebido durante o estágio e por toda a amizade.

Ao Professor Ricardo Bexiga, o meu co-orientador, pela sua disponibilidade e paciência para me ajudar a escrever este trabalho. Também por toda a ajuda na procura de opções para o meu estágio curricular, pela transmissão de conhecimentos, fornecimento de literatura necessária para a tese e por todas as sugestões e motivação que me deu no processo de escrita.

Ao professor Telmo Nunes, pela disponibilidade para esclarecer as minhas dúvidas e enorme paciência para me ajudar todas as vezes que precisei de recorrer ao seu conhecimento.

Ao Dr. Rui Silva pela disponibilidade para me deixar acompanhá-lo no seu trabalho diário. Também por todos os conhecimentos transmitidos, por tudo o que me permitiu observar e aprender no mundo da clínica, cirúrgia e reprodução de bovinos, e por todos os valiosos concelhos que me deu.

À minha colega de estágio, pelo apoio que me deu durante o estágio, por ter puxado por mim para avançar com este trabalho, mesmo quando a fadiga acumulada durante o estágio, dificultava esse processo e pela sua grande amizade.

À Graça pelas sugestões e toda a ajuda que me deu.

A toda a minha família, em especial ao meu pai, por toda a sua ajuda na escrita e na resolução de pormenores que dificultaram a realização deste trabalho, e aos meus avós, por me receberem em terras ribatejanas, onde realizei a primeira parte do meu estágio curricular. A todos os meus amigos da faculdade, especialmente aqueles com quem partilhei tanto tempo à frente do computador na biblioteca.

Ensaio de vacina de rebanho contra agentes de metrite numa exploração bovina leiteira

Resumo

Após o parto, desenvolve-se um ambiente propício para o crescimento bacteriano no lúmen uterino, enquanto se verifica uma depressão das defesas imunitárias inatas do útero. Frequentemente, os agentes patogénicos no interior do útero persistem e causam metrite, uma infeção que causa prejuízos consideráveis às explorações leiteiras devido, essencialmente ao impacto que tem a nível da fertilidade e da produção leiteira. Para além dos métodos terapêuticos mais utilizados, nomeadamente a antibioterapia, a solução para este problema pode passar pela prevenção vacinal. Pretendeu-se saber se, a vacina autógena, ou seja a utilização de vacinas produzidas a partir de microorganismos isolados de animais doentes para serem aplicadas nos animais desse efetivo, prevenia efetivamente a metrite num efetivo.

Neste estudo, com o propósito de testar a eficácia de uma vacina de rebanho contra a metrite, foram incluídas 177 vacas de uma exploração na região Centro do país, em 2 grupos de testagem (administração de vacina inativada com *Escherichia coli* e *Trueperella pyogenes*) e 2 grupos de controlo (administração de placebo, sem qualquer conteúdo bacteriano), sendo que cada grupo de testagem e controlo era constituído apenas por nulíparas (39 - testagem; 38 – controlo) ou vacas (50 – testagem; 50 – controlo). A administração do controlo e da vacina foi feita em duas doses separadas (vacas - 60 \pm 15 dias antes da data prevista do parto e 6 \pm 9 dias depois; nulíparas - 30 \pm 7 dias antes da data prevista do parto e 23 \pm 5 dias depois). Depois do parto, a metrite foi diagnosticada por medição da temperatura retal aos 4-10 dias pós-parto e palpação retal, com avaliação da dimensão do útero e do aspeto do corrimento vaginal, aos 11-17 dias pós-parto. Além dos casos de metrite, também foram registados todos os casos de distócia, gemelaridade, animais com historial de doença uterina, e todos os casos diagnosticados de retenção placentária, hipocalcémia clínica, cetose e deslocamento do abomaso à esquerda.

Nas múltiparas, houve uma diminuição considerável na ocorrência de metrite entre os indivíduos do grupo de testagem (12,5% dos casos) e os indivíduos do grupo de controlo, observando-se 1 caso no primeiro face a 7 no segundo grupo. No geral, a vacinação esteve significativamente associada a uma menor ocorrência de metrite na população testada e reduziu a probabilidade de ocorrer a doença em cerca de um quinto comparativamente à probabilidade de não ocorrer. Nenhum dos fatores de risco testados (paridade, dificuldade de parto, gemelaridade, hipocalcémia clínica e historial de doença uterina) foi considerado como relevante na obtenção destes resultados pelos métodos estatísticos utilizados. Foi ainda analisada a influência da metrite e da vacinação na produção leiteira. Para as múltiparas, a produção total aos 30 dias pós-parto foi significativamente maior nas vacas que não tiveram metrite.

Palavras-chave: Metrite; Vacina de rebanho; Fatores de risco; Produção leiteira

Trial with autogenous vaccine against metritis pathogens in a dairy farm

Abstract

After parturition, a suitable environment for bacterial growth develops in the uterine lumen, while there is a depression of the innate immune defenses of the uterus. Often, the pathogenic uterine agents persist and cause metritis, an infection that causes considerable losses to dairy farms, mainly due to the impact on fertility and milk production. In addition to the most commonly used therapeutic methods, such as antibiotic therapy, the solution to this problem may include prevention through vaccination. The objective of this study was to know if autogenous vaccination, which is the use of vaccines produced using microorganisms isolated from sick animals to be applied in animals in that herd, effectively prevented metritis in a dairy herd.

In this study, carried out to test the effectiveness of a herd vaccine against metritis, 177 cows from a farm in the country's central region, were included in two test groups (inactivated vaccine administration, containing *Escherichia coli* and *Trueperella pyogenes*) and 2 control groups (placebo administration, with no bacterial content), each test and control group including heifers (39 - test, 38 - control) or cows (50 - test, 50 - control) alone. Vaccine and control administration was made in two separated times (cows - 60 ± 15 days before the expected date of parturition and 6 ± 9 days later, heifers - 30 ± 7 days before the expected date of parturition and 23 ± 5 days later). After parturition, metritis was diagnosed by rectal temperature assessment at 4-10 days postpartum and rectal examination, with assessment of uterine size and vaginal discharge characteristics, at 11-17 days postpartum. In addition to the metritis cases, all cases of dystocia, twin pregnancy, animals with uterine disease history, and all diagnosed cases of retention of fetal membranes, clinical hypocalcemia, ketosis and left displacement of the abomasum were recorded.

For multiparous cows, there was a considerable reduction in the incidence of metritis between subjects from the test group (12.5% of total cases) and the control group: while 1 case was observed on the first, 7 were observed on the second group. In general, vaccination was significantly associated with a lower incidence of metritis in the tested population and it reduced the odds of disease occurrence to about one fifth compared to the odds of no disease development. None of the risk factors tested (parity, calving difficulty, twin pregnancy, clinical hypocalcemia and uterine disease history) were considered relevant for the obtained result by the statistical methods used. The influence of metritis and vaccination on milk yield was also analyzed. For multiparous cows, total milk production at 30 days postpartum was significantly higher in cows that did not develop metritis.

Keywords: Metritis; Herd vaccine; Risk factors; Milk yield

Índice

Agradecimentos	i
Resumo.....	iii
Abstract	v
Índice.....	vi
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tabelas	x
Lista de Gráficos	xi
Lista de abreviaturas e siglas	xii
Resumo das atividades desenvolvidas em estágio	xiv
Introdução	1
I – Revisão bibliográfica	3
1 - Retorno à atividade reprodutiva após o parto	3
1.1 - Involução uterina.....	3
1.2 - Retorno à ciclicidade após o parto	4
2 - Defesas do aparelho reprodutivo	7
3 - Definição da doença	8
4 - Etiopatogenia.....	10
4.1 - Contaminação do útero	10
4.2 - Fatores de risco.....	11
4.2.1 - Papel dos agentes patogénicos	12
4.2.1.1 - Infecção bacteriana	12
4.2.1.2 - Infecção viral	14
4.2.2 - Fatores de risco associados ao hospedeiro	15
4.2.2.1 - Doenças ou alterações físicas do trato genital	15
4.2.2.1.1 - Fatores associados ao parto	15
4.2.2.1.2 - Retenção placentária.....	16
4.2.2.2 - Fatores relacionados com nutrição e problemas metabólicos	16
4.2.2.2.1 - Cetose e o papel dos AGNE e BHB circulantes	16
4.2.2.2.2 - Papel do IGF-1.....	18
4.2.2.2.3 - Hipocalcémia	18
4.2.2.2.4 - Outras deficiências minerais e vitamínicas	19
4.2.2.3 - Paridade.....	20
4.2.2.4 - Influência endócrina no periparto.....	20
4.2.2.5 - Fatores genéticos.....	21
4.2.3 - Fatores relacionados com o ambiente e sistema de produção.....	22
4.2.3.1 - Condições de higiene na maternidade	22
4.2.3.2 - Sistema de produção	22

4.2.3.3 - Tamanho do efetivo.....	23
4.2.3.4 - Aptidão produtiva.....	23
4.2.3.5 - Estação do ano e temperatura	23
5 - Complicações clínicas	23
6 - Incidência.....	24
7 - Impacto nas explorações	25
7.1 - Impacto na reprodução	26
7.1.1 - Evidência da infertilidade nos índices reprodutivos.....	26
7.1.2 - Doença uterina e infertilidade.....	27
7.2 - Impacto na produção leiteira	30
8 - Diagnóstico	30
8.1 - Sinais clínicos e palpação retal	31
8.2 – Exame vaginal	32
8.3 – Ultrassonografia.....	33
8.4 – Bacteriologia	33
8.5 – Citologia	34
8.6 - Histopatologia.....	34
8.7 - Outros métodos de diagnóstico auxiliares	34
9 - Tratamento	35
9.1 - Antibioterapia.....	36
9.1.1 - Antibioterapia sistêmica.....	36
9.1.2 - Antibioterapia intrauterina.....	36
9.1.3 - Princípios ativos.....	37
9.2.3.1 - Penicilinas	37
9.2.3.2 - Tetraciclina.....	38
9.2.3.3 - Cefalosporinas	38
9.3.4 - Outras Infusões intrauterinas.....	39
9.3.5 - Terapia hormonal	40
9.3.5.1 - PGF _{2α}	40
9.3.5.2 - Oxitocina.....	40
9.3.6 - Terapêutica de suporte	41
10 - Prevenção	41
10.1 - Maneio nutricional	41
10.2 – Antibioterapia como prevenção	43
10.3 - Vacinação.....	44
10.3.1 - Princípios de imunização por vacinação.....	44
10.3.2 - Imunossupressão a nível dos anticorpos naturais na patogenia da metrite.....	46
10.3.3 - Tipos de vacinação utilizados para doenças bacterianas	46
10.3.4 - Auto-vacinas e vacinas e de rebanho	47

10.3.4.1 - Produção de vacinas de rebanho	48
10.3.4.2 - Vantagens da utilização de vacinas de rebanho.....	48
10.3.5 - Vacinas para metrite.....	48
II – Tema: Testagem de vacina de rebanho numa exploração de leite	51
1 - Objetivos do trabalho	51
2 - Materiais e métodos.....	51
2.1 - Caracterização da exploração.....	51
2.2 – Amostragem.....	52
2.3 – Vacinação.....	53
2.4 - Recolha de dados.....	54
2.4.1 – Metrite	54
2.4.2 - Problemas relacionados com o parto – Dificuldade de parto, gemelaridade e retenção placentária (RP).....	54
2.4.3 - Hipocalcémia clínica (HC)	54
2.4.4 – Cetose	54
2.4.5 - Deslocamento do abomaso à esquerda (DAE)	54
2.5 - Registo dos dados	55
2.6 - Análise estatística	55
3 – Resultados.....	55
3.1 - Animais excluídos do estudo	55
3.2 - Análise de frequências e descritiva dos dados.....	56
3.3 - Associação entre a metrite e respetivos fatores de risco predisponentes com a vacinação....	58
3.4 - Associação entre os vários fatores de risco e ocorrência de metrite.....	59
3.5 - Associação da vacinação com cetose e deslocamento do abomaso à esquerda.....	59
3.6 - Associação da produção leiteira total aos 30 dias pós-parto (Leite30) com vacinação e com metrite	60
4 – Discussão.....	62
4.1 - Vacinação e metrite.....	62
4.2 - Fatores de risco para a metrite	63
4.3 - Fatores com influência na incidência de metrite segundo o modelo de regressão logística bivariada	64
4.4 - Vacinação e doenças associadas à metrite - cetose e deslocamento de abomaso à esquerda (DAE)	65
4.5 – Produção leiteira aos 30 dias pós-parto (Leite30)	65
5 – Conclusão.....	66
Bibliografia	68
Anexos.....	85
Anexo I – Dados das primíparas que permitiram a análise estatística em formato SPSS	85
Anexo II – Dados das múltiparas que permitiram a análise estatística em formato SPSS	86
Anexo III	88

Lista de Figuras

Figura 1 - As alterações que ocorrem a nível das carúnculas após o parto durante o processo de involução uterina (adaptado de Noakes, 2009).	4
Figura 2 - Incidência de contaminação bacteriana no útero e infeção uterina em vacas leiteiras no pós-parto (adaptado de Sheldon et al., 2009).	11
Figura 3 - Corrimento purulento extraído, através do Metrichcek, do cérvix de uma vaca nas primeiras semanas do pós-parto. Esta vaca foi diagnosticada com metrite (Original).	33
Figura 4 - Diferenças na resposta imunitária a uma primeira e a uma segunda exposição a um determinado antigénio injetado num animal (Antigénio A), demonstrando o fenómeno de memória imunitária (adaptado de Owen et al., 2009).	45

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Procedimentos cirúrgicos assistidos no estágio na Fonte Leite S.A.	xiv
Tabela 2 – Casuística encontrada em bovinos no estágio na Vetttotal.	xvi
Tabela 3 – Casuística encontrada em pequenos ruminantes no estágio na Vetttotal.	xvii
Tabela 4 – Casuística encontrada em equinos no estágio na Vetttotal.	xvii
Tabela 5 – Casuística encontrada em suínos no estágio na Vetttotal.	xvii
Tabela 6 – Procedimentos cirúrgicos assistidos durante o estágio na Vetttotal.	xviii
Tabela 7 - Incidência de metrite puerperal em 10 países diferentes calculada a partir de amostragens de dimensões diferentes, escolhidas aleatoriamente de várias explorações distintas (Adaptado de Suthar et al., 2013).	25
Tabela 8 – Análise das frequências das duas classes representativas de cada variável considerada no estudo da vacinação, metrite, paridade e restantes fatores de risco para a ocorrência de metrite.	57
Tabela 9 - Análise descritiva do total de produção leiteira aos 30 dias pós-parto (Leite30) em vacas primíparas.	57
Tabela 10 - Análise descritiva do total de produção leiteira aos 30 dias pós-parto (Leite30) em vacas múltiparas.	57
Tabela 11 – Tabulação cruzada dos resultados encontrados para a metrite e os fatores de risco considerados durante o estudo para o desenvolvimento desta com os resultados da vacinação, em vacas primíparas e múltiparas, separadamente.	58
Tabela 12 – Resultados de modelo final do teste de regressão logística bivariada para a associação da metrite com a vacinação, paridade, dificuldade de parto, gemelaridade, retenção placentária, hipocalcemia clínica e historial de doença uterina, com o método backward wald.	59
Tabela 13 – Resultados do teste Qui-quadrado para a associação da variável “vacinação” com as variáveis “cetose” e “deslocamento do abomaso”.	60
Tabela 14 – Médias de produção leiteira total aos 30 dias pós-parto (Leite30) nas primíparas relativamente às variáveis “metrite” e “vacinação”.	60
Tabela 15 – Médias de produção leiteira total aos 30 dias pós-parto (Leite30) nas múltiparas relativamente às variáveis “metrite” e “vacinação”.	61
Tabela 16 – Resultado do teste Mann-Whitney para a associação da produção leiteira aos 30 dias pós-parto (Leite30) em litros com a metrite nas vacas múltiparas, com os valores de <i>rank</i> médio das duas classes da variável “metrite”.	61
Tabela 17 - Resultado do teste Mann-Whitney para associação da produção leiteira aos 30 dias pós-parto (Leite30) em litros com a metrite nas vacas múltiparas, com o valor de significância determinado.	61
Tabela 18 - Teste Mann-Whitney para a associação da produção leiteira aos 30 dias pós-parto (Leite30) em litros com a vacinação nas vacas múltiparas.	88
Tabela 19 - Teste Mann-Whitney para a associação da produção leiteira aos 30 dias pós-parto (Leite30) em litros com a vacinação nas vacas primíparas.	88
Tabela 20 - Teste Mann-Whitney para a associação da produção leiteira aos 30 dias pós-parto (Leite30) em litros com a metrite nas vacas primíparas.	88

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Proporção de casos relacionados com diferentes especialidades, acompanhados na Quinta Fonte Letite S.A.....	xv
Gráfico 2- Proporção de casos nas diferentes espécies acompanhados no estágio na Vetttotal.	xv
Gráfico 3 - Proporção de casos de distócia e de aborto acompanhados no estágio na Vetttotal.....	xvii

Lista de abreviaturas e siglas

DNA	Ácido desoxirribonucleico
AGNE	Ácidos gordos não-esterificados
AGPS	Ácidos gordos Polinsaturados
AINE	Anti-inflamatórios não esteroides
BEN	Balanço energético negativo
BHB	β –hidroxibutirato
Ca	Cálcio
cm	Centímetros
Cu	Cobre
B	Coeficiente de regressão
CEE	Comunidade Económica Europeia
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CC	Condição corporal
RBCC	Contagem de eritrócitos
WBCC	Contagem de leucócitos
CVP	Corrimento vaginal purulento
DAE	Deslocamento do abomaso à esquerda
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EUA	Estado Unidos da América
ERO	Espécie reativa de oxigénio
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IGF-2	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
FND	Fibra neutro detergente
P	Fósforo
<i>F. necrophorum</i>	<i>Fusobacterium necrophorum</i>
HT	Hematocrito
GnRH	Hormona libertadora de gonadotrofina
BoHV-4	Herpesvirus bovino 4
HC	Hipocalcémia clínica
HDU	Historial de doença uterina
FSH	Hormona folículo-estimulante
LH	Hormona luteinizante
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IMS	Ingestão de matéria seca
IA	Inseminação artificial
IL	Interleucina
I. C.	Intervalo de Confiança
LTB4	Leucotrieno B4
L	Litros

Mn	Manganês
<i>M. haemolytica</i>	Mannheimia haemolytica
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mmol	Milimoles
Mo	Molibdênio
MUC1	Mucina 1
p	nível de significância
N	Número de indivíduos
AMP	Péptidos antimicrobianos
<i>P. melaninogenica</i>	Prevotella melaninogenica
Leite30	Produção de leite aos 30 dias pós-parto
PRID	Progesterone releasing intravaginal device
PGE₂	Prostaglandina E2
PGF_{2α}	Prostaglandina F2 alfa
PT	Proteínas totais
PMN	Polimorfonucleares
kg	Quilogramas
RI	Resistência à insulina
RP	Retenção placentária
Se	Selênio
GH	Somatotropina/Hormona do crescimento
TLR	Recetores tipo toll
TLR	Recetores tipo toll tipo 4
TR	Temperatura retal
TMR	Total mixed ration
<i>T. pyogenes</i>	Trueperella pyogenes
Exp(B)	Valor de <i>odds ratio</i>
Zn	Zinco

Resumo das atividades desenvolvidas em estágio

O estágio curricular realizado para a conclusão do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária foi separado em duas componentes, produção leiteira com gado bovino e clínica de campo, as quais tiveram lugar em dois locais distintos, de Setembro a meio de Novembro na Quinta Fonte Leite S.A. – grupo Ortigão Costa, e de meio de Novembro a Janeiro na empresa Vetttotal, respetivamente.

A primeira parte do estágio consistiu no acompanhamento do trabalho do médico veterinário em regime permanente na exploração leiteira Quinta Fonte Leite S.A., o Dr. José Alface, bem como do trabalho dos engenheiros zootécnicos da exploração. O trabalho realizado compreendeu as várias áreas de intervenção do médico veterinário numa exploração leiteira:

- Exames clínicos das vacas em fase de produção e na recria e tratamentos adequados a cada situação;
- Necrópsias de animais que morreram na exploração. Nos exames post-mortem realizados, foram identificadas, como causas de morte, 4 pneumonias, 1 toxémia, 1 clostridiose e 1 síndrome de veia cava;
- Controlo reprodutivo, realizado semanalmente, com diagnósticos de gestação ao 1º e 3º mês pós-inseminação e antes das vacas serem secas, por ecografia transrectal e por palpação rectal respetivamente. Além dos diagnósticos de gestação também eram feitos protocolos de sincronização de cios. Ainda era feita regularmente a avaliação da condição uterina das vacas no período pós-parto;
- Resolução cirúrgica de diversas doenças (Tabela 1), tanto em vacas adultas na fase de produção como em vitelos;

Correção de deslocamento do abomaso à esquerda	Omentopexia no lado direito Abomasopexia no lado esquerdo	7 2
Herniorrafia		1
Tenotomia dos flexores digitais		1
Laparotomia exploratória		1
Cesariana com histerectomia		1

Tabela 1 – Procedimentos cirúrgicos assistidos no estágio na Fonte Leite S.A.

- Detecção de mamites clínicas e subclínicas e controlo da qualidade do leite na sala de ordenha. Para esse efeito era feita a visualização dos jatos de leite, uso do Teste Californiano de Mastites, recolha de amostras de leite por rotina para microbiologia e ainda era praticada regularmente uma monitorização do número de células somáticas no leite dos tanques. Também era feita semanalmente a secagem das vacas e por vezes era necessário testar-se a presença de resíduos de antibiótico no leite com o kit Delvotest®;
- Vacinações, descorna de vitelos e outras operações de manejo na exploração (reparações, manejo das vacas em ordenha, tarefas diárias do vitleiro, etc.).

No total foram diagnosticados e acompanhados 230 casos na exploração, pela análise dos quais se conclui que a mamite foi a patologia mais frequente, com 70 casos no período de estágio (Gráfico 1). Das restantes patologias diagnosticadas e tratadas neste estágio a diarreia foi a patologia mais frequente relacionada com o aparelho digestivo (17 casos), a metrite foi a mais frequente de entre os casos relacionados com o aparelho reprodutor (42 casos) e a hipocalcémia foi a mais vezes diagnosticada e tratada das patologias relacionadas com problemas metabólicos.

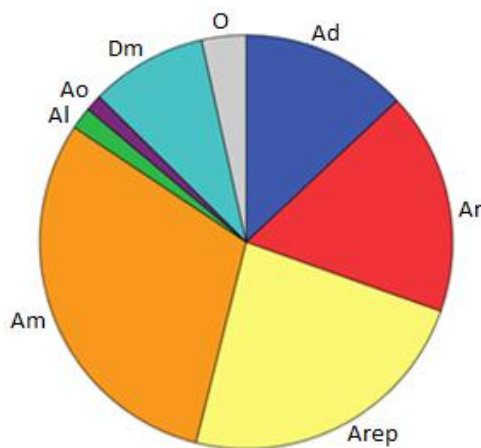


Gráfico 1 - Proporção de casos relacionados com diferentes especialidades, acompanhados na Quinta Fonte Letite S.A. Aparelho digestivo (Ad) - 30 casos; Aparelho respiratório (Ar) - 40 casos; Aparelho reprodutor (Arep) - 54 casos; Aparelho mamário (Am) - 70 casos; Aparelho locomotor (Al) - 4 casos; Aparelho ocular (Ao) - 3 casos; Patologias metabólicas (Dm) - 21 casos; Outras patologias (O) - 7 casos (6 onfalites e 1 peritonite).

A componente de clínica de campo realizada na empresa Vetttotal consistiu no acompanhamento do trabalho do Dr. Rui Silva no Alentejo Litoral e Algarve, nos concelhos de Odemira, Sines, Santiago de Cacém, Ourique, Aljezur, Lagos, Lagoa, Monchique, Silves e Vila do Bispo. Além do regime de consultas também foram necessárias muitas intervenções em regime de emergência. O trabalho incidiu essencialmente na clínica e ações de saneamento de animais de produção (na maioria bovinos de aptidão de carne, mas também pequenos ruminantes, suínos, equídeos e cães). No entanto houve também uma significativa componente de cirurgia e reprodução de bovinos.

- As atividades praticadas no âmbito da sanidade foram as seguintes:

-) teste da tuberculina em bovinos (464);
-) recolha de sangue de bovinos (464), ovinos (434) e suínos (10);
-) vacinação de bovinos (464), ovinos (994), suínos (16), equinos (1) e canídeos (2);
-) desparasitação de bovinos (178), ovinos (1066) e equinos (1).

- Nas consultas médicas assistidas pelo autor deste trabalho verificaram-se 144 casos clínicos em bovinos, maioritariamente de aptidão para a produção de carne, sendo esta a espécie mais frequente em consultas clínicas (Gráfico 2).

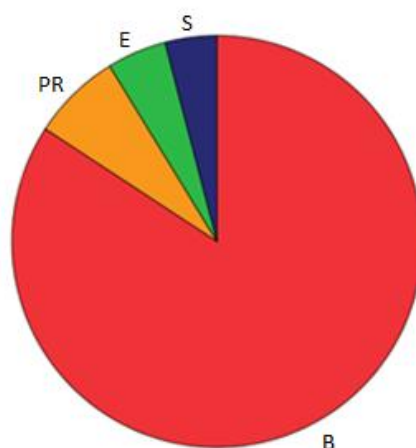


Gráfico 2- Proporção de casos nas diferentes espécies acompanhadas no estágio na Vetttotal. Bovinos (B) - 144 casos; Pequenos ruminantes (PR) - 12 casos; Equinos (E) - 8 casos; Suínos (S) - 7 casos.

Dentro dos casos encontrados nos bovinos, as pneumonias foram as mais frequentemente diagnosticadas (Tabela 2).

Aparelho digestivo	Paratuberculose	1
	Diarreia por <i>Cryptosporidium</i>	2
	Diarreia por coccídeo	4
	Diarreia de etiologia desconhecida	7
	Cólica	1
	Obstipação	1
	Indigestão	2
	Timpanismo	2
	Acidose ruminal sub-aguda	3
	Volvo intestinal	1
	Corpo estranho	2
Aparelho respiratório	Pneumonia	21
	Laríngeo-traqueíte	3
Aparelho urinário	Hidronefrose	1
	Nefrite	1
Aparelho reprodutor	Metrite	1
	Vaginite	1
	Retenção placentária	4
Aparelho mamário	Mamite	6
	Edema do úbere	1
Aparelho cardíaco	Pericardite	1
	Outras cardiopatias	1
Aparelho ocular	Uveíte	1
	Cegueira idiopática	1
Aparelho locomotor	Dermatite interdigital	6
	Dermatite digital	2
	Úlcera na sola	3
	Hiperplasia interdigital	1
	Artrite séptica	4
	Lesões músculo-esqueléticas	13
Patologias metabólicas	Hipocalcémia	1
	Hipofosfatémia	2
	Cetose	1
Patologias dermatológicas	Papilomatose	2
	Alopecia parasitária	1
Outras patologias que afetam um ou mais que um sistema	Peritonite	1
	Disenteria de Inverno	3
	Outras pneumoenterites	7
	Piroplasmose	11
	Faringite	1
	Mediastinite	1
	Otite	2
	Intoxicação	1
	Carências nutricionais	9
	Choque hipotérmico	2
	Morte súbita	1

Tabela 2 – Casuística encontrada em bovinos no estágio na Vetttotal.

Nos pequenos ruminantes a diarreia por clostridiose foi a doença mais vezes encontrada (Tabela 2). Nos suínos todas as patologias diagnosticadas eram de origem infecciosa (Tabela 3) e, quanto aos equinos, os casos de cólica foram os mais frequentemente observados (Tabela 4).

Diarreia por clostridiose (ovinos)	6
Moneziose (caprino)	1
Artirite encefalite caprina	5

Tabela 3 – Casuística encontrada em pequenos ruminantes no estágio na Vetttotal.

Cólica	3
Hepatite aguda	1
Obstrução esofágica	1
Mamite	2
Laminite	1

Tabela 4 – Casuística encontrada em equinos no estágio na Vetttotal.

Doença dos edemas	2
Síndrome de mastite, metrite e agalaxia	1
Mal rubro	2
Infeção do trato urinário	1
Clostridiose nervosa	1

Tabela 5 – Casuística encontrada em suínos no estágio na Vetttotal.

- A componente da reprodução consistiu principalmente na assistência de partos distócicos, que era feita na maioria das vezes com auxílio da alavanca obstétrica, mas também pela cesariana. Também era feita assistência em caso de aborto, seja para auxiliar na extração do feto morto como para tentar diagnosticar a causa subjacente à sua morte. No Gráfico 3 estão agrupados os casos de distócia encontrados de acordo com a causa subjacente e os casos de aborto, concluindo-se que a apresentação anormal foi a causa de distócia mais frequentemente registada, tendo sido observados casos de flexão dos curvilhões, codilhos, boletos, cabeça e anca.

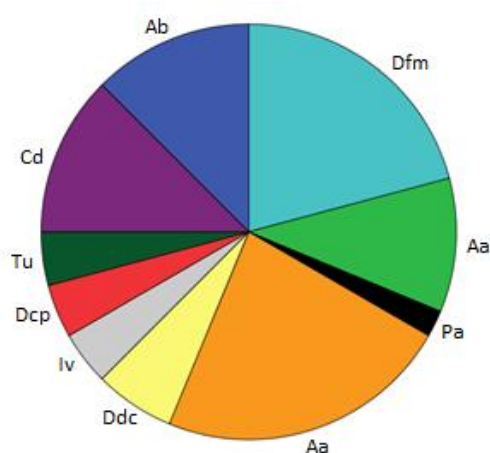


Gráfico 3 - Proporção de casos de distócia e de aborto acompanhados no estágio na Vetttotal. Desproporção feto - materna (Dfm) – 10 casos; Apresentação anormal (Aa) - 5 casos; Posicionamento anormal (Pa) – 1 caso; Atitude anormal (Aa) – 11 casos; Deficiente dilatação cervical (Ddc) – 3 casos; Imaturidade vulvar (Iv) – 2 casos; Deformação do canal pélvico (Dcp) – 2 casos; Torção uterina (Tu) - 2 casos; Distócia de causa desconhecida (Cd) – 6 casos; Abortos (Ab) – 6 casos.

Ainda nesta área, foi utilizada a ultrassonografia para realizar diagnósticos de gestação, exame do trato reprodutivo da fêmea e dos ovários, deteção de possíveis causas de infertilidade e caracterização de anestros, e recolha de informação relativa à fase do ciclo éstrico e à viabilidade das estruturas ováricas para começar protocolos de sincronização, através do exame dos ovários e do útero. Durante o período de estágio foram feitos 526 controlos reprodutivos, com auxílio da ultrassonografia, sendo que a grande maioria destes foi em vacas de produção leiteira (447). Também foi feito um exame ultrassonográfico numa cabra para confirmar aborto.

Foram ainda realizados 15 exames andrológicos em touros com o objetivo de descrever a aptidão reprodutora dos mesmos num relatório requerido pelo produtor. Nesta área voltou a ser utilizada a ultrassonografia como método auxiliar na deteção de anomalias no tronco testicular.

- Na vertente da cirurgia, o autor assistiu e participou em 39 procedimentos cirúrgicos, a maioria no âmbito da obstetrícia em bovinos de carne.

As cirurgias assistidas durante o período deste estágio estão agrupadas na Tabela 5.

Cesariana	Bovino	4
	Ovino	1
Histerectomia		1
Vaginoplastia		1
Sutura de laceração perineal 1º grau		1
Correção de prolapso vaginal e sutura de Buhner		1
Correcção de prolapso uterino e sutura de Buhner		5
Sutura de útero ruturado		2
Episiotomia		2
Discorna	Com cauterizador	15
	Com fio serra de Gigli	1
Amputação de dígito sem <i>flap</i>		1
Excisão de tumor da 3ª pálpebra		3
Sutura de laceração profunda		1

Tabela 6 – Procedimentos cirúrgicos assistidos durante o estágio na Vetttotal. Todos os procedimentos representados foram realizados em bovinos, com exceção de uma cesariana num ovino.

Introdução

Das 3 semanas antes do parto até às 3 semanas após o parto, o chamado período de transição, ocorrem alterações metabólicas com implicações importantes para a saúde da vaca leiteira, havendo uma predisposição acentuada para a ocorrência de doenças (Drackley, 1999). A relação de diversos fatores de risco, associados ao parto e às alterações metabólicas durante o período de transição, com o desenvolvimento de metrite tem sido estabelecida ao longo dos anos, com novas relações a serem ainda investigadas recentemente (Markusfeld, 1987; Bicalho et al., 2014). A maioria dos problemas reprodutivos ocorrem no pós-parto, daí que, neste período, se pretenda reduzir ao mínimo os fatores que podem implicar a ocorrência dos primeiros (Palmer, 2015).

Há uma maior frequência de infeções a nível do útero nos bovinos do que noutras espécies de ruminantes, como os ovinos (Regassa & Noakes, 1999). A inflamação do endométrio pode ocorrer a seguir à cópula ou inseminação artificial, mas o mais comum é após o parto (Dhaliwal, 2001). De facto, as infeções uterinas são um problema frequente neste período (Palmer, 2015).

Os impactos da metrite na economia das explorações leiteiras é um problema que se faz sentir neste sector em todo o mundo (Bartolome, Khalloub, de la Sota, Drillich & Melendez, 2014). Através da sua influência a nível da função do útero e da atividade ovárica, esta doença torna-se uma condicionante da capacidade reprodutiva dos efetivos (Sheldon, Cronin, Goetze, Donofrio & Schuberth, 2009).

O melhoramento da eficiência reprodutiva é uma etapa de primordial importância caso se pretenda aumentar a rentabilidade de uma exploração leiteira e, para este efeito, é necessário controlar os custos sem recorrer a investimentos com muito capital (Smith, Oltenacu & Erb, 1988).

O tratamento das infeções uterinas continua a ser uma temática controversa (Bartolome et al., 2014). Tradicionalmente, o método de escolha é a antibioterapia, no entanto algumas limitações têm sido impostas a nível da Europa em relação à sua utilização e existe uma crescente preocupação relativa ao seu uso excessivo (Palmer, 2015; Vallat, 2016; Younger, 2016).

No sentido de procurar melhores alternativas aos tratamentos mais utilizados, os investigadores têm explorado a possibilidade de atuar pela prevenção, com opções viáveis em termos práticos, essencialmente através da diminuição das quebras a nível imunitário com o reforço das defesas imunes inatas e adaptativas (Machado et al., 2014a; Machado, Bicalho, Gilbert & Bicalho, 2014b).

Este trabalho pretende abordar o tema da metrite e de alternativas na prevenção desta doença, que possam ser utilizadas em detrimento dos tratamentos convencionais, na perspetiva de melhorar o conhecimento referente a estratégias mais eficazes que evitem os impactos da doença na produção e eficiência reprodutiva dos bovinos e, por conseguinte, na economia das explorações leiteiras.

Neste sentido, o trabalho divide-se em duas partes. Na primeira, com base na revisão das publicações existentes, é abordado o tema da metrite, das consequências negativas associadas que incidem na indústria leiteira e dos métodos preventivos que constituem uma boa alternativa aos tratamentos convencionais. Posteriormente, é apresentado o trabalho experimental em que se baseia a presente dissertação, relativo à testagem de uma vacina de rebanho para a metrite no pós-parto, num grupo de

vacas de uma exploração leiteira. Para além da demonstração dos resultados, é feita uma discussão dos mesmos com o objetivo de definir conclusões práticas.

I – Revisão bibliográfica

1 - Retorno à atividade reprodutiva após o parto

Normalmente, pelas 6 semanas do pós-parto, o trato genital já deve ter apenas poucos sinais da gestação anterior e deve estar preparado para suportar uma nova prenhez (Sheldon et al., 2009).

Após o parto, para que uma vaca de leite atinga níveis de fertilidade ótimos é necessário que haja uma involução rápida do útero, sem traumas, e ao mesmo tempo uma breve retomada da ciclicidade ovárica normal, com a detecção precisa do estro posteriormente e alta eficiência em termos de concepção (Ptaszynska, 2009).

1.1 - Involução uterina

O processo de involução uterina ocorre durante as primeiras 6 semanas do pós-parto e consiste num processo de regeneração do endométrio até cerca de 23 dias pós-parto, pelo qual ocorre a redução do seu tamanho e expulsão da lóquia (Ptaszynska, 2009; Noakes, 2009; Palmer, 2015). Esta última refere-se a um corrimento normal de líquidos fetais e sangue dos vasos sanguíneos umbilicais roturados e tecido proveniente do útero, nomeadamente fragmentos das carúnculas separadas e necrosadas, e também restos de membranas fetais (Ptaszynska, 2009; Palmer, 2015).

A necrose da base das carúnculas com a sua posterior separação leva à redução do peso do útero de 13 kg para 1 kg, desde a altura do parto a 3 semanas depois (Sheldon, Williams, Miller, Nash, Herath, 2008).

Geralmente, ocorre perda de lóquia durante os primeiros 7 a 10 dias do pós-parto (Ptaszynska, 2009). Este corrimento altera-se progressivamente dum estado mais espesso, mucóide e sanguinolento para um corrimento purulento e a sua cor varia de castanho avermelhado para amarelado (Palmer, 2015; Noakes, 2009). A lóquia normal não tem um odor desagradável (Noakes, 2009).

O volume da lóquia varia em grande quantidade de indivíduo para indivíduo. Podem ser medidos 500 ml nas vacas primíparas até 1000 a 2000 ml em vacas múltiparas e, nalguns casos, pode haver absorção total dentro do útero (Ptaszynska, 2009; Noakes, 2009). A maior quantidade expelida ocorre nos primeiros 2-3 dias, ficando reduzida por volta dos 8 dias e desaparecendo antes dos 14-18 dias do pós-parto (Noakes, 2009).

A redução do tamanho do trato genital da vaca decorre, geralmente durante 3 semanas, numa escala logarítmica decrescente, notando-se a maior diferença nos primeiros dias do pós-parto (Ptaszynska, 2009; Noakes, 2009). Todo o útero já é palpável por via rectal aos 8 e 10 dias do pós-parto nas primíparas e múltiparas respetivamente (Noakes, 2009).

Também se regista uma diminuição progressiva da regularidade, frequência, amplitude e duração das contrações uterinas ao longo de alguns dias.

A velocidade de involução do útero não gravídico varia mais em comparação com a involução do útero previamente gravídico e está dependente do seu envolvimento no processo de placentação (Noakes, 2009).

O processo de re-epitelização das carúnculas (Figura 1) ocorre principalmente a partir das glândulas uterinas que as rodeiam, por meio de crescimento celular centrípeto. Geralmente, a partir dos 25 dias pós-parto já pode haver completa regeneração do epitélio, embora as camadas mais profundas do útero só se encontrem totalmente regeneradas após 6 a 8 semanas (Sheldon et al., 2008; Noakes, 2009).

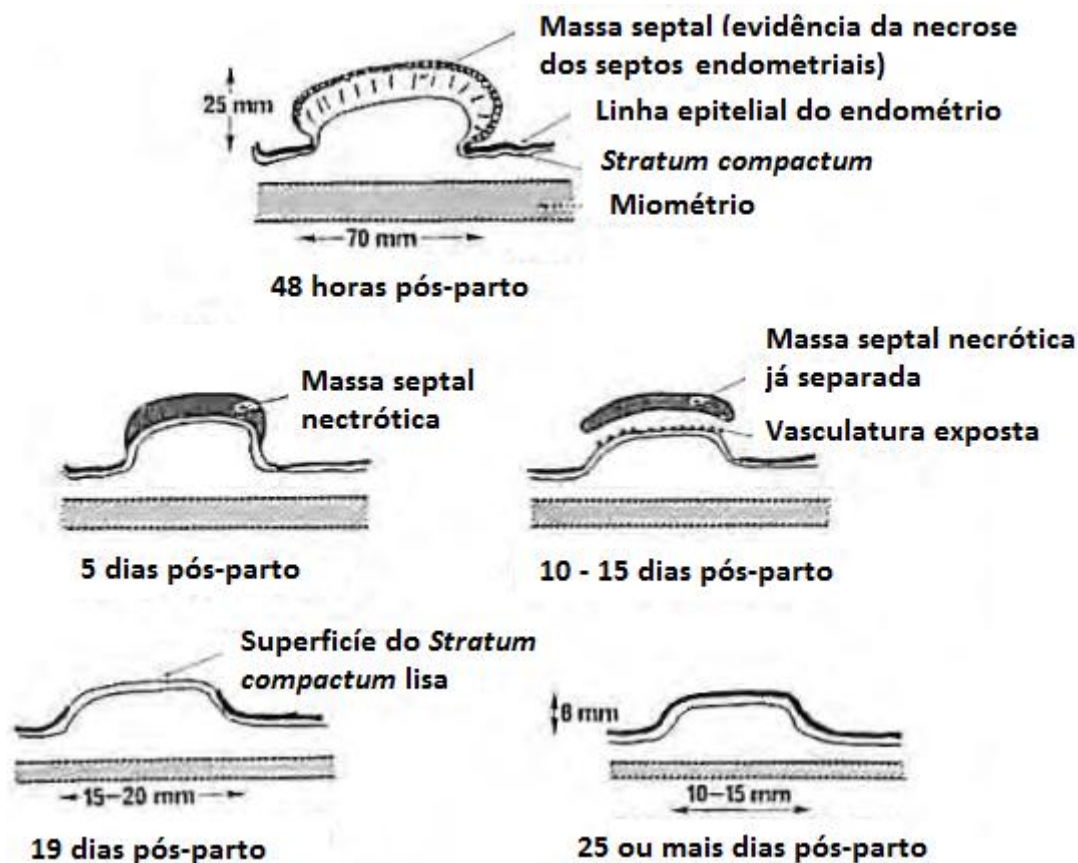


Figura 1 - As alterações que ocorrem a nível das carúnculas após o parto durante o processo de involução uterina (adaptado de Noakes, 2009).

Uma das ações fisiológicas da prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) bem estudada desde há décadas é a sua capacidade de induzir contrações no músculo liso e levar ao aumento da tonicidade uterina (Lindell, Kindahl, Jansson & Edqvist, 1982). A libertação de $PGF_{2\alpha}$ inicia a regressão do corpo lúteo a partir das 24 a 36 horas e promove as contrações miométricas, iniciando o parto (Davidson & Stabenfeldt, 2013). O processo de involução do útero está dependente da duração da libertação de $PGF_{2\alpha}$ (Lindell et al., 1982).

1.2 - Retorno à ciclicidade após o parto

No final da gestação, as concentrações de progesterona e estrogénio aumentam em relação ao que se verifica no início da gestação, particularmente o estrogénio que tem um aumento progressivo que começa a partir dos 60 dias (Ambrose, 2015). Os altos níveis de estrogénio, por si só ou juntamente com os altos níveis de progesterona, suprimem o eixo hipotálamo-hipofisário e inibem a secreção de GnRH (Yavas & Walton, 2000; Ambrose, 2015). Isto resulta na acumulação de FSH na hipófise anterior e supressão da libertação da mesma, e supressão da produção de LH, com a redução das reservas

hipofisárias (Yavas & Walton, 2000). Esta inibição do eixo hipotálamo-hipofisário-ovário é responsável pela ausência de ciclicidade e estado de anestro que se verifica no pós-parto (Ambrose, 2015).

A libertação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ suprime a produção de progesterona entre as 12 e as 24 horas antes do parto (Davidson & Stabenfeldt, 2013). Por outro lado, os níveis de estrogénio continuam a aumentar e atingem um pico nas últimas 24 horas antes do parto. No entanto, devido ao facto da sua produção ser maioritariamente de origem placentária, as concentrações de estrogénio descem para valores basais após o parto (Ambrose, 2015).

Na ausência do efeito de feedback negativo causado pelo estrogénio, no pós-parto, o eixo hipotálamo-hipofisário retoma a produção e libertação de GnRH (Beam & Butler, 1997; Ambrose, 2015). Desta forma, observa-se de novo o padrão normal de libertação de FSH pela hipófise anterior (Ambrose, 2015).

A libertação da FSH impulsiona o desenvolvimento folicular (Yavas & Walton, 2000). Os pulsos de FSH começam por volta do dia 3 do pós-parto e permanecem constantes a partir daí, tendo as mesmas flutuações que se observam nas vacas cíclicas (Yavas & Walton, 2000; Ambrose, 2015). Os níveis armazenados de LH aumentam gradualmente após o parto, voltando a verificar-se o padrão de libertação pulsátil normal desta hormona mais tarde, dependendo de diversos fatores (Ambrose, 2015).

Os folículos em crescimento produzem estradiol e inibina, que por sua vez inibem a produção de FSH, provocando uma queda nos níveis desta hormona. Normalmente, o folículo de maiores dimensões da mesma onda irá expressar uma maior quantidade de recetores para LH e de proteases da proteína ligante de IGF-1 (Ambrose, 2015). Esta última permite a manutenção de níveis elevados de IGF-1, importantes para sensibilizar as células da granulosa à ação da FSH durante a fase final de crescimento folicular (Mazerbourg, Bondy, Zhou & Monget, 2003). Este folículo mantém-se em crescimento apesar das concentrações mais baixas de FSH, enquanto os outros folículos da mesma onda interrompem o seu crescimento, sendo assim o folículo dominante. O crescimento deste passa a ser, principalmente, dependente da existência de frequência adequada do pulso de LH (Roche, 2006). Os pulsos de LH são necessários para o crescimento dos folículos a partir dos 9 mm de diâmetro (Ambrose, 2015).

O primeiro folículo dominante é capaz de produzir maiores quantidades de estradiol (Beam & Butler, 1997). Isto é necessário para aumentar a libertação de LH pelo efeito de feedback positivo do estradiol, ao que se segue o pico pré-ovulatório de LH, seguido da ovulação e retoma da atividade cíclica dos ovários (Yavas & Walton, 2000; Sheldon et al, 2009). Por outro lado, o descrito pode não suceder caso o folículo dominante não consiga produzir uma libertação suficiente de estradiol para que ocorra a ovulação. Neste caso, o folículo sofre atresia e haverá de seguida a emergência de uma ou mais ondas foliculares. Outra possibilidade é a formação de um quisto folicular a partir do folículo dominante não ovulatório (Beam & Butler, 1997). Mesmo após a primeira ovulação pós-parto, nem todas as vacas voltam a ciclar normalmente e acabam por permanecer anéstricas (Ambrose, 2015). Sheldon et al. (2009), constataram que é a formação do corpo lúteo após a primeira ovulação pós-parto que marca o reinício da atividade cíclica dos ovários.

Segundo Roche (2006), os fatores mais importantes que determinam o destino do folículo dominante são os seguintes:

-) Tamanho do folículo dominante: folículos < 1 cm de diâmetro raramente ovulam;
-) Frequência de pulso de LH à qual o folículo dominante é exposto: a frequência de pulso mínima para que ocorra ovulação é cerca de 1 pulso por hora, a qual garante um aumento suficiente nos níveis de estradiol, para que o efeito de feedback positivo que este faz sobre a produção de LH leve à ovulação;
-) Concentração sistêmica de IGF-1.

A progesterona afeta a frequência do pulso de LH e por conseguinte, durante a fase lútea, pode inibir o desenvolvimento dos folículos dominantes. Baixas concentrações de progesterona podem permitir o aumento da frequência do pulso de LH e a continuação do crescimento do folículo dominante, impedindo que este sofra atresia e que se forme uma nova onda folicular (Roche, 2006). Na maioria dos casos, as vacas Holstein apresentam ciclos de duas ondas foliculares (Sartori, Haughian, Shaver, Rosa & Wiltbank, 2004). A diminuição do número de ondas reduz a duração da dominância do folículo pré-ovulatório, e isto permite obter taxas de concepção à 1ª IA mais altas em vacas submetidas a programas de sincronização do estro (Austin, Mihm, Ryan, Williams & Roche, 1999; Roche, 2006).

Geralmente, a primeira ovulação após o parto ocorre sem sinais de estro, aquilo que se chama uma ovulação silenciosa. Isto ocorre devido à ausência do efeito pré-éstrico da exposição à progesterona (Yavas & Walton, 2000). De facto, a exposição de vacas anéstricas ao efeito da progesterona pode levar a uma maior produção de estradiol, porque parece estimular uma maior libertação de LH e o desenvolvimento de mais recetores de LH nos folículos pré-ovulatórios (Rhodes, McDougall, Burke, Verkerk & Macmillan, 2003). Isto ocorre possivelmente devido a uma redução nos recetores de estradiol no hipotálamo, com menor efeito de feedback negativo sobre a libertação de GnRH e LH, tal como ocorre antes das novilhas atingirem a puberdade (Rhodes et al., 2003, Day & Anderson, 1998). Quando se sujeitam vacas a tratamentos hormonais cujo protocolo inclui um período de suplementação com progesterona, a maioria dos animais expressam o estro e a fase lútea que se segue tem uma duração normal, com maiores taxas de fertilidade comparativamente aos animais não sujeitos a esse tratamento (Rhodes et al., 2003).

Após a primeira ovulação, a primeira fase lútea é breve, e isto deve-se, principalmente, a uma libertação precoce de PGF_{2α} pelo útero (Cooper, Carver, Villeneuve, Silvia & Inskeep, 1991). Esta última é libertada em pulsos pelo útero em resposta à ativação dos recetores de oxitocina, cuja formação está dependente do estradiol produzido pelo folículo dominante em crescimento (Davidson & Stabenfeldt, 2013).

Sheldon, Noakes & Dobson (2002a) mostraram, através de exames ultrassonográficos em vacas no pós-parto, que é preferencialmente no ovário contralateral ao corno uterino previamente gravídico onde o primeiro folículo dominante é selecionado. Num estudo anterior, Sheldon, Noakes & Dobson (2000) comprovaram que também havia menor crescimento folicular no ovário ipsilateral ao corno previamente gravídico. Esta supressão da foliculogénese vai diminuindo à medida que aumenta o tempo de pós-parto (Sheldon et al., 2000).

Todos estes eventos ocorrem em qualquer vaca depois do parto, independentemente do seu estado de saúde, carências nutricionais ou de qualquer fator ambiental (Sheldon et al., 2008).

2 - Defesas do aparelho reprodutivo

O útero está protegido da contaminação do exterior primariamente pela existência de um sistema imune inato que consiste num conjunto de defesas anatómicas, fisiológicas, fagocíticas e inflamatórias (Sheldon & Dobson, 2004; Singh, Murray, Mshelia & Woldehiwet, 2008).

As primeiras consistem na vulva, vagina, vestíbulo e cérvix, que funcionam como uma barreira física à entrada de bactérias no trato genital, encontrando-se o cérvix fechado durante a gestação (Sheldon & Dobson, 2004; Davidson & Stabenfeldt, 2013). A componente fisiológica inclui o muco secretado pelo cérvix e pela vagina, principalmente durante o estro, que flui em direção ao exterior e impede a entrada de material que possa contaminar o útero (Sheldon & Dobson, 2004; Senger, 2005). As camadas musculares uterinas, circular e longitudinal, constituem também uma defesa física inata porque promovem a expulsão das bactérias presentes no muco. A invasão do lúmen uterino por células fagocíticas a partir da circulação periférica, no caso de ocorrer contaminação bacteriana, constitui a principal barreira fagocítica. Já a barreira inflamatória consiste na atuação de moléculas de defesa imunitária, como as proteínas de fase aguda, a lactoferrina e as defensinas (Singh et al., 2008).

A imunidade humoral atua através da produção seletiva de IgG e IgA pelo endométrio. Os níveis destas imunoglobulinas no fluido uterino aumentam com a gravidade da inflamação (Singh et al., 2008). A importância do papel das imunoglobulinas na defesa imunitária a nível do útero será abordada com mais pormenor mais adiante.

Os neutrófilos são as primeiras células fagocitárias serem recrutadas para eliminar as bactérias e contribuir para a formação de pus no útero, seguidas, mais tarde pelo recrutamento dos macrófagos, células que contribuem na deteção de padrões moleculares associados a agentes patogénicos e para a iniciação da cascata inflamatória (Sheldon & Dobson, 2004; LeBlanc, 2014).

Inicialmente, o mecanismo de defesa imunitário inato desempenhado pelos polimorfonucleares (PMN) é o predominante no sistema de defesa do útero (LeBlanc, 2014). Estas células possuem recetores tipo toll (TLR) que detetam componentes microbianos, como as endotoxinas, o peptidoglicano e o DNA bacteriano. (Sheldon & Dobson, 2004; Sheldon et al., 2009). Está comprovado que as células do endométrio também possuem estes recetores, um dos quais, o TLR-4, deteta os lipopolissacáridos (LPS) da membrana das bactérias Gram-negativas, logo é importante na defesa contra agentes como *Escherichia coli* (*E. coli*) (Sheldon, 2009; Singh et al., 2008). Forma-se então uma cascata de sinalização que culmina na libertação de citocinas proinflamatórias como o TNF_{α} e algumas interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8). Estas citocinas, além de promoverem pirécia, levam a um maior recrutamento de células do sistema imunitário e estimulam a secreção hepática de proteínas de fase aguda (Sheldon & Dobson, 2004).

Como a iniciação da cascata de sinalização e da resposta imune inata está dependente da quantidade de TLR-4 envolvida no reconhecimento do LPS, assim que a produção destas moléculas é deprimida, a capacidade de identificação do agente patogénico presente pelos neutrófilos no pós-parto diminui (Younger, 2016).

Sheldon et al. (2009) reviu o papel das moléculas de defesa imunitária a nível uterino. Do grupo dos péptidos antimicrobianos (AMP), o tecido uterino expressa o AMP lingual, AMP traqueal, β -defensinas neutrofilicas bovinas e β -defensinas bovinas. Este grupo de péptidos é particularmente importante para a imunidade das mucosas. Outra molécula que pode ter um papel importante na eliminação de agentes patogénicos no útero é a mucina-1 (MUC1), uma proteína transmembranária glicosilada presente nas células epiteliais do endométrio. As proteínas de fase aguda contribuem para a defesa imunitária neutralizando diretamente os agentes causadores da inflamação, impedindo a progressão da lesão tecidual, promovendo a eliminação dos agentes contaminantes e a reparação dos tecidos (Steel & Whitehead, 1994). Num teste feito *in vitro* não foram detetadas quaisquer proteínas de fase aguda em tecido endometrial bovino, no entanto, são produzidas pelo fígado em resposta às citocinas libertadas no processo inflamatório, estando os seus níveis mais elevados durante as primeiras semanas do pós-parto (Sheldon et al., 2009). De facto, outros estudos comprovam que a presença de contaminação bacteriana no útero com *E. coli* e *Trueperella pyogenes* (*T. pyogenes*) está associada com o aumento das concentrações sanguíneas de α_1 – glicoproteína ácida e ceruloplasmina (Sheldon, Noakes, Rycroft & Dobson, 2001).

O objetivo final deste processo é produzir uma resposta inflamatória rápida, eficiente, mas contida, em oposição a um estado de inflamação grave e/ou prolongado que possa não ser tão benéfico para a eficiência reprodutiva da vaca (LeBlanc, 2014).

3 - Definição da doença

É comum haver alguma confusão no uso do termo “metrite” quando se utiliza este para caracterizar uma infeção a nível do útero. É importante que tanto os clínicos como os investigadores utilizem corretamente a terminologia para evitar confusões de interpretação (Palmer, 2015). Muitos investigadores não referem qual o seu critério para diagnosticar e classificar as infeções uterinas, dificultando a tarefa de comparar estudos e interpretar os dados (Lewis, 1997).

As infeções uterinas podem ser distinguidas a nível histológico e clínico. No primeiro caso a denominação torna-se mais simples. Se a inflamação ocorrer a nível do endométrio dá-se o nome de endometrite, se ocorrer a nível de toda a parede uterina é uma metrite e se ocorrer a nível da serosa é uma perimetrite. Caso a inflamação inclua os ligamentos suspensores é uma parametrite (Jubb, Kennedy & Palmer, 2016). No caso da perimetrite, a inflamação não está bem delimitada, como se observa na endometrite, embora possa estender-se para outras superfícies serosas de outros órgãos (Bondurant, 1999).

Pela perspetiva histopatológica, a metrite pode ser distinguida da endometrite pelo facto de se tratar de uma inflamação que atinge todas as camadas da parede uterina, enquanto que a endometrite é uma inflamação superficial que apenas atinge o endométrio e que nunca se propaga para além do *stratum spongiosum* (Bondurant, 1999; Sheldon, Lewis, LeBlanc & Gilbert., 2006).

Do ponto de vista clínico, a definição de metrite mais utilizada na literatura foi revista por Sheldon et al. (2008) e, segundo estes autores, a metrite puerperal é definida como uma doença com sinais sistémicos (depressão, queda na produção de leite, toxémia) e febre (considerada quando a temperatura rectal é superior a 39,5 °C), na qual o útero se apresenta de dimensões anormalmente grandes e com um corrimento aquoso, de odor fétido e de cor castanho avermelhado, estando a vaca ainda dentro de um período de 21 dias de pós-parto. No entanto, segundo esta definição, pode dar-se

o nome de metrite clínica a uma inflamação que não resulte em sinais sistêmicos, mas que leve ao aumento anormal do útero e expulsão de corrimento uterino purulento, dentro dos 21 dias pós-parto.

Já a endometrite, adquire normalmente a classificação de clínica ou subclínica (Sheldon et al., 2008). No entanto, foi sugerido recentemente a terminologia de corrimento vaginal purulento (CVP) para o primeiro caso, já que a presença deste nunca foi ligado comprovadamente à inflamação no endométrio, diferindo da endometrite citológica, caracterizada por um aumento na proporção de PMN presentes em amostras citológicas do útero. Esta última poderá levar à saída de corrimento purulento pela vagina, mas nem sempre. Foi proposto que ambos poderão estar associados a diferentes manifestações da endometrite (Duboc, Duffield, Leslie, Walton & LeBlanc, 2010a).

A presença de CVP corresponde a um conteúdo de pus superior a 50%, ou mucopurulento, que significa que cerca de metade do conteúdo corresponde a pus e a outra metade muco, detetáveis na vagina a partir dos 21 dias pós-parto e a partir dos 26 dias pós-parto, respetivamente (LeBlanc et al., 2002; Sheldon et al., 2008). LeBlanc, Osawa e Dubuc (2011), numa revisão de estudos anteriores, chegaram à conclusão que um valor de 5 a 8% de neutrófilos em relação ao total de leucócitos e células endometriais presentes num esfregaço de citologia endometrial, retirada entre as 4 e 5 semanas pós-parto, indica já um nível de inflamação prejudicial. No entanto, uma endometrite subclínica pode ser definida por uma percentagem de neutrófilos superior a 18%, se recolhidas entre os 21 e os 33 dias pós-parto ou superior a 10% se recolhidas entre os 34 e os 47 dias. Como as camadas mais profundas do útero não estão afetadas no caso da endometrite, não se observa um grande aumento no tamanho do mesmo em relação ao normal (Sheldon et al., 2008).

Quando um animal contrai uma infeção uterina durante o pós-parto, a absorção de exotoxinas e endotoxinas bacterianas para a corrente sanguínea pode resultar em sinais associados a toxémia, desenvolvendo-se aquilo que se chama uma metrite tóxica (Pulfer & Riese, 1991). Esta é considerada a forma mais grave da doença, com pior prognóstico (Sheldon et al., 2009).

Tendo em conta que a gravidade da doença é relacionável com os sintomas observáveis, foi proposta por Sheldon et al. (2009) uma classificação para a metrite baseada na gravidade dos sinais clínicos apresentados (Földi et al., 2006; Sheldon et al., 2009):

-) Grau 1 – Útero anormalmente aumentado e presença de corrimento uterino purulento sem quaisquer sinais sistêmicos observáveis;
-) Grau 2 – Os mesmos sinais da metrite de grau 1 juntamente com sinais sistêmicos, tais como queda na produção de leite, depressão e febre > 39,5 °C;
-) Grau 3 – Os mesmos sinais da metrite de grau 2 juntamente com sinais de toxémia, tais como inapetência, depressão e/ou colapso e extremidade frias.

A metrite é uma doença muito mais grave que a endometrite, pelo que requer uma identificação mais urgente dos animais afetados e uma abordagem terapêutica diferente, com foco não só na infeção uterina mas também no alívio dos sinais sistêmicos (Sheldon et al., 2008). Pensa-se que a gravidade da metrite diminui com o tempo, havendo uma proporção destes casos que acaba por persistir como endometrite (Palmer, 2015).

A piómetra, por sua vez, implica a acumulação de pus no lúmen uterino, com o cérvix fechado e a presença de um corpo lúteo. Mesmo que na endometrite haja também a presença de um corpo lúteo frequentemente, o cérvix não se encontra fechado (Sheldon et al., 2008).

4 - Etiopatogenia

Foi estabelecido que a causa das doenças inflamatórias no útero passa por uma falha do sistema imunitário de fazer a transição de um estado deprimido, necessário para a manutenção da gestação, para um estado mais ativo e funcional no pós-parto, capaz de eliminar os microrganismos contaminantes e os tecidos necrosados, reduzindo a inflamação em 3 a 4 semanas (LeBlanc, 2014).

4.1 - Contaminação do útero

Antes de ocorrer o parto, durante a gestação, o lúmen uterino é um ambiente estéril (Földi et al., 2006). Durante e após o parto, o cérvix, a vagina e a vulva deixam de exercer o efeito de barreira física contra contaminações do exterior como acontece durante a gestação, havendo dilatação do cérvix e relaxamento da vulva (Noakes, 2009; Sheldon & Dobson, 2004; Földi et al., 2006). Surge então uma oportunidade para as bactérias ascenderem no trato genital a partir do ambiente exterior, da pele do animal e também das fezes (Földi et al., 2006).

A partir da altura em que há contaminação bacteriana do útero, ao longo do período do pós-parto, vai ocorrendo um ciclo repetitivo de infeção, eliminação do agente contaminante e reinfeção do útero. A perpetuação deste ciclo depende da presença de substrato para contaminação bacteriana, do grau de contaminação e da eficácia dos mecanismos de defesa imunitária uterina (Palmer, 2015).

De facto, segundo dados apresentados por Sheldon et al. (2009), representados na Figura 2, quase a totalidade das vacas leiteiras têm contaminação bacteriana do útero por volta das 2 semanas pós-parto. É importante manter presente que é possível haver contaminação bacteriana no lúmen uterino de vacas que não exibem sinais clínicos de infeção no útero (Sheldon et al., 2009). Além disso, a inflamação uterina é um fenómeno constante no processo de involução do útero (LeBlanc, 2014).

Segundo estudos recentes, a bacteriémia, deve ser considerada uma ocorrência comum nas vacas durante o período do pós-parto. Um estudo que contemplou um grupo de vacas de leite controlo saudáveis no período pós-parto e outro de vacas de leite diagnosticadas com metrite puerperal, comprovou que a bacteriémia é uma situação comum tanto para as vacas saudáveis no pós-parto como para aquelas com metrite puerperal, mostrando que 53% das vacas de cada grupo tinham bacteriémia ao serem analisadas antes dos 10 dias pós-parto (Credille et al., 2014).

Segundo estudos recentes, a bacteriémia, deve ser considerada uma ocorrência comum nas vacas durante o período do pós-parto. Um estudo que contemplou um grupo de vacas leiteiras controlo saudáveis no período pós-parto e outro de vacas leiteiras diagnosticadas com metrite puerperal, comprovou que a bacteriémia é uma situação comum tanto para as vacas saudáveis no pós-parto como para aquelas com metrite puerperal, mostrando que 53% das vacas de cada grupo tinham bacteriémia ao serem analisadas antes dos 10 dias pós-parto (Credille et al., 2014).

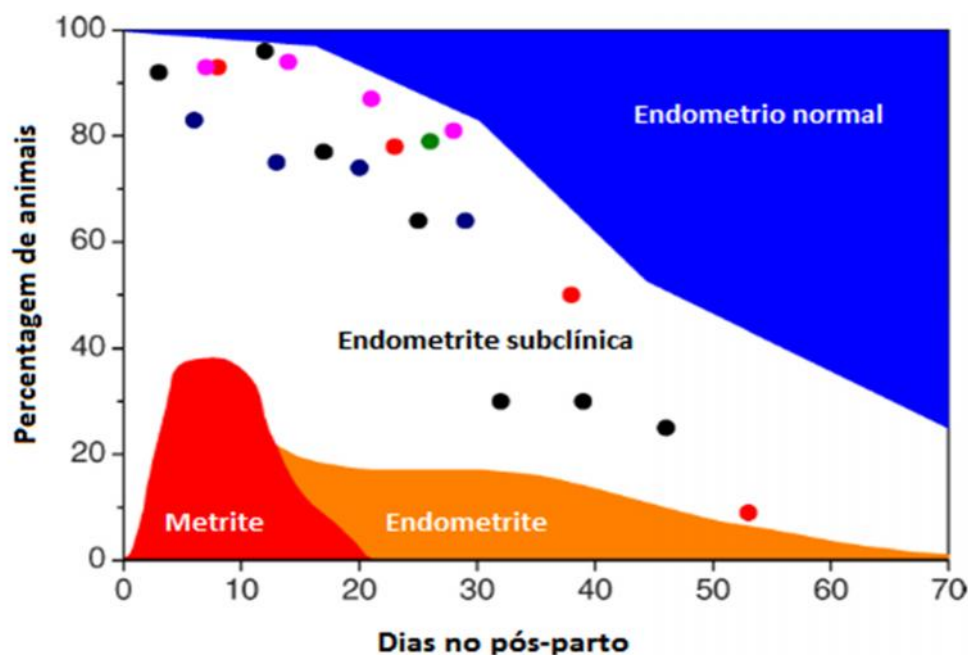


Figura 2 - Incidência de contaminação bacteriana no útero e infecção uterina em vacas leiteiras no pós-parto. Círculos: porcentagem de animais com isolados bacterianos colhidos do lúmen uterino; Áreas sombreadas representam a proporção de vacas diagnosticadas com metrite, endometrite, endometrite subclínica e com endométrio normal, a vermelho, cor-de-laranja, branco e azul, respetivamente (adaptado de Sheldon et al., 2009)

A barreira epitelial formada pela superfície do endométrio impede a invasão bacteriana para os tecidos adjacentes e para a circulação sanguínea, logo, havendo um contacto mais prolongado entre as bactérias invasoras do ambiente uterino durante o período do pós-parto com o endométrio, que se encontra desprovido em parte dessa barreira física, haverá um maior risco de bacteriemia. Pensa-se que este risco está associado tanto à colonização bacteriana do útero em processo de involução, como a imunossupressão durante o pós-parto e inflamação sistémica (Credille et al., 2014).

Caso o crescimento de bactérias com ação patogénica nos tecidos uterinos se sobreponha às defesas imunitárias inatas do animal, ou melhor, se o balanço entre a patogenicidade do agente infeccioso e a capacidade imunitária do hospedeiro inclinar a favor do primeiro, o animal irá desenvolver doença clínica (LeBlanc, 2014; Sheldon et al., 2009). Dependendo da gravidade, do *timing* e da duração do processo inflamatório, bem como da sua capacidade para influenciar a eficiência reprodutiva da vaca, a inflamação poderá considerar-se fisiológica ou patológica (LeBlanc, 2014).

Na maioria dos casos, a involução uterina deverá levar à remoção da infeção bacteriana e reparação do epitélio, havendo posteriormente diminuição da inflamação uterina (LeBlanc, 2014). O aparecimento de uma infeção uterina e a sua persistência estão dependentes da presença de um ambiente uterino propício, fatores genéticos e do estado da imunidade inata responsável pela defesa do trato reprodutivo (Williams et al., 2005).

4.2 - Fatores de risco

Os fatores de risco que podem predispor um bovino a contrair uma infeção uterina são muito diversos e interrelacionam-se, tendo já sido revistos em vários estudos por vários autores (Markusfeld, 1987;

Kaneene & Miller, 1995; Lewis, 1997; Bruun, Ersbøll & Alban, 2002; Sheldon & Dobson, 2004; Földi et al., 2006; Benzaquen et al., 2007; Bicalho et al., 2010; Duboc et al., 2010b; Martinez et al., 2012; LeBlanc, 2014; Machado & Bicalho, 2015).

Podem ser divididos naqueles que estão associados ao agente patogénico, ao hospedeiro e ao ambiente onde estes se encontram (Machado & Bicalho, 2015). Como já foi referido no presente trabalho, há a possibilidade de prevalecerem determinados agentes com ação patogénica no útero que podem resistir às defesas imunitárias do animal. Relativamente aos fatores associados ao hospedeiro, para além de uma possível contribuição genética, podem referir-se aqueles que estão relacionados com danos a nível do trato genital (problemas no parto e retenção placentária, por exemplo), aqueles que estão relacionados com problemas metabólicos, tais como a condição corporal demasiado baixa ou alta, cetose, hipocalcémia, desequilíbrios minerais e vitamínicos, e ainda aqueles que estão relacionados com a diminuição da capacidade imunitária do hospedeiro, por exemplo, por alterações endócrinas durante o pós-parto (Markusfeld, 1987; Kaneene & Miller, 1995; Földi et al., 2006; Herath et al., 2011; Martinez et al., 2012; Bicalho et al., 2014). Quanto aos fatores ambientais, destacam-se algumas características do sistema de produção, da estabulação, da maternidade e do nível de higiene do local de parto, podendo estes influenciar o risco de ocorrer uma metrite (Kaneene & Miller, 1995; Sheldon & Dobson, 2004; Machado & Bicalho, 2015).

4.2.1 - Papel dos agentes patogénicos

4.2.1.1 - Infecção bacteriana

Na altura do pós-parto, o lúmen uterino fornece um ambiente propício para o crescimento de populações bacterianas aeróbicas e anaeróbicas (Sheldon et al., 2008). Nas primeiras 2 semanas após o parto é possível isolar do ambiente uterino uma grande variedade de espécies bacterianas (Földi et al., 2006).

Num ensaio de Huszenicza et al. (1999), durante os primeiros 10 dias após o parto, não se tendo estabelecido uma infecção uterina aguda, as espécies isoladas do lúmen uterino foram maioritariamente *E. coli*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Bacillus* spp. Algumas destas espécies, nomeadamente *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp., por terem uma maior prevalência comprovada quando na ausência de doença uterina, poderão fazer parte de uma flora comum e não patológica do útero durante esta fase da involução uterina (Huszenicza et al., 1999).

Escherichia coli, *T. pyogenes*, *Staphylococcus* spp., streptococci hemolíticos, *Peptostreptococcus* spp., *Fusobacterium necrophorum* (*F. necrophorum*), *Prevotella melaninogenica* (*P. melaninogenica*), *Bacteroides* spp., *Mycoplasma bovis*, *Ureoplasma* spp., *Pasteurella* spp., *Histophilus somni*, *Pseudomonas aeruginosa*, alguns coliformes e *Clostridium* spp. foram associados a casos de infecção uterina (Kuhn & Hopkins, 1983; Stephans, Slee, Poulton, Larcombe & Kosior, 1986; Bonnet, Martin, Gannon, Miller & Etherington, 1991; Del Vecchio, Matsas, Fortin, Sponenberg & Lewis, 1994; Huszenicza et al., 1999; Risco, Youngquist & Shore, 2007; Sheldon et al., 2008; Ghanem et al., 2013; Palmer, 2015). O último pode ser responsável por uma infecção gangrenosa grave no útero (Risco et al., 2007).

Baseado em publicações anteriores, Williams et al. (2005) propuseram uma classificação em que separavam os agentes isolados de colheitas uterinas de acordo com o seu potencial patogénico e associação com casos de endometrite:

- Agentes associados a lesões endometriais e reconhecidos como agentes patogénicos para o útero: *T. pyogenes*, *E. coli*, *F. necrophorum* e *P. melaninogenica*;
- Agentes frequentemente isolados do lúmen uterino e associados a casos de endometrite, mas não especificamente com lesões uterinas: *Bacillus licheniformis*, *Enterococcus faecalis*, *Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica*), *Pasteurella multocida*, *Peptostreptococcus* spp., *Staphylococcus aureus* e streptococci não hemolíticos;
- Agentes oportunistas já isolados em algumas amostras do lúmen uterino e não associados com endometrite: *Clostridium perfringens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus* spp., *Providencia stuartii*, *Proteus* spp., *Staphylococcus* spp. (coagulase negativos), streptococci α -Haemolítico, *Streptococcus acidominimus* e *Aspergillus* spp.

Muitas destas bactérias acabam por ser eliminadas pelos mecanismos de defesa uterina anteriormente referidos (Sheldon et al., 2008).

Os agentes mais frequentemente associados às infeções uterinas são *E. coli* e *T. pyogenes* (Ruder et al., 1981; Bonnet et al., 1991; Del Vecchio et al., 1994; Williams et al., 2005; Dolezel, Palenik, Cech, Kohoutova & Vyskocil, 2010).

Escherichia coli parece surgir, geralmente, numa fase mais precoce da contaminação do útero, e há indícios de que as infeções por este agente suscetibilizam o mesmo para uma posterior infeção por *T. pyogenes* (Williams et al., 2007). Este último já havia sido referido como *Corynebacterium pyogenes*, *Actinomices pyogenes* e *Arcanobacterium pyogenes* (Quinn, Markey, Carter, Donnelly e Leonard, 2002). No entanto, foi feita uma revisão taxonómica recentemente que levou à alteração do nome desta espécie (Yassin, Hupfer, Siering & Schumann, 2011).

Foram descobertos seis fatores de virulência de *E. coli* intestinal e extraintestinal associados à ocorrência de metrite e endometrite. O gene *fimH*, aparentemente, associado à adesão de *E. coli* às células endometriais, foi o mais prevalente deles todos e também o mais importante no estabelecimento destas doenças (Bicalho et al., 2010; Sheldon et al., 2010).

Trueperella pyogenes parece ser o agente que causa as lesões endometriais mais graves (Bonnet et al., 1991). Os fatores de virulência expressados por *T. pyogenes*, que contribuem para a sua patogenicidade, são a piolisina, a proteína de ligação ao colagénio e o *fimA*, um componente de fimbria (Bicalho, Machado, Oikonomou, Gilbert & Bicalho, 2012). Baseado em trabalhos anteriores, Sheldon et al., (2009) referem que todas as estirpes de *T. pyogenes* isoladas, até à data, de amostras provenientes do útero, expressam o gene de virulência *plo* que codifica para a produção da piolisina, uma citotoxina colesterol dependente que poderá provocar lise celular nas células do epitélio endometrial e do estroma através da ligação à membrana e formação de um poro que permite a passagem de fluido para o meio intracelular.

Em infecções uterinas induzidas, o potencial de oxidação-redução do ambiente uterino diminui, criando-se um ambiente anaeróbio. Pensa-se que isto se deve à produção de certos metabolitos pelas bactérias já presentes no útero e ao consumo de oxigênio por parte dos PMN ativos na eliminação da infecção (El-Azab et al., 1988). Esta situação permite que agentes anaeróbios facultativos, como *T. pyogenes*, e estritos, como *F. necrophorum*, proliferem neste ambiente (Bicalho et al., 2012).

Houve uma forte correlação positiva encontrada na presença de *T. pyogenes* e das restantes bactérias anaeróbias com efeito patogênico no útero (Bonnet et al., 1991). Estes agentes atuam sinergicamente no sentido de prevalecerem, aumentando a probabilidade de ocorrer doença a nível do útero. *Fusobacterium necrophorum* e *P. melaninogenica* produzem uma leucotoxina e uma substância que inibe a fagocitose, respetivamente (Ruder et al., 1981; Sheldon et al., 2009). Assim protegida das defesas do hospedeiro, *T. pyogenes*, por sua vez, produz uma catalase e um fator de crescimento necessários para a proliferação de *F. necrophorum* (Ruder et al., 1981).

Os genes *fimH* e *lktA* (que codifica para a leucotoxina), os respetivos fatores de virulência de *E. coli* e *F. necrophorum*, foram ambos associadas a uma maior prevalência de metrite quando detetados aos 1-3 dias em leite e aos 8-10 dias, respetivamente (Bicalho et al., 2012). O mesmo autor também descobriu que cerca de 90% das vacas positivas para a presença do fator de virulência *fimH* aos 1-3 dias em leite acabaram por sofrer contaminação de *F. necrophorum* uma semana depois.

O crescimento da população bacteriana patogénica está associado ao aparecimento de pus no corrimento. Trata-se de uma consequência da infeção bacteriana e é formado a partir de uma mistura de neutrófilos, tecido necrótico e fluido. A presença de corrimento a nível da vagina com características purulentas, mucopurulentas e com odor fétido foi associado com uma maior densidade de crescimento de bactérias consideradas patogénicas para o útero, tais como *E. Coli* (odor fétido), *T. Pyogenes* (corrimento purulento ou mucopurulento e odor fétido) e *F. necrophorum* (corrimento purulento ou mucopurulento), mas não de agentes oportunistas (Williams et al., 2005).

4.2.1.2 - Infeção viral

O herpesvírus bovino 4 (BoHV-4) é um agente viral já associado a casos de metrite bovina durante o pós-parto (Donofrio, Franceschi, Capocefalo, Cvirani & Sheldon, 2009). Este vírus expressa os genes IE assim que infecta a célula hospedeira no endométrio, utilizando os fatores de transcrição produzidos pela mesma (Donofrio et al., 2008).

Foram relatados frequentemente casos de metrite com a presença concomitante de BoHV-4 e as principais bactérias implicadas com a infeção uterina no pós-parto (*E. coli* e *T. pyogenes*) (Frazier et al., 2001).

As bactérias que contaminam o útero podem estimular a replicação do BoHV-4 após induzirem a cascata inflamatória que atrai os macrófagos infetados pelo vírus da corrente sanguínea para o local onde está a decorrer a inflamação (Donofrio et al., 2008). Foi sugerida a teoria dum círculo vicioso no qual uma infeção bacteriana no endométrio leva não só à acumulação de LPS bacteriano mas também à secreção de PGE₂ pelas células endometriais, os quais estimulam a replicação viral e consequentemente levam à formação de mais lesões (Sheldon et al., 2009).

4.2.2 - Fatores de risco associados ao hospedeiro

4.2.2.1 - Doenças ou alterações físicas do trato genital

4.2.2.1.1 - Fatores associados ao parto

As dificuldades associadas ao parto, tais como a distócia, os nados mortos ou os partos gemelares, podem estar associados à ocorrência de metrite diretamente, funcionando como fatores de risco independentes, ou podem ser vistos como fatores que atuam pelas relações que têm uns com os outros (Markusfeld, 1987; Kaneene & Miller, 1995; Benzaquen et al., 2007; Bicalho et al., 2010). Por exemplo, a redução da força das contrações musculares uterinas, que se deve ao *stress* mecânico nas distócias ou ao aumento do tamanho do útero nas gestações gemelares, podem levar ambas ao atraso no parto e morte do feto, outro fator de risco para a metrite (Markusfeld, 1987).

Também pode ser considerada a associação indireta que estabelecem por funcionarem igualmente como fatores de risco para a retenção placentária e para algumas doenças metabólicas como a hipocalcemia, cetose e deslocamento do abomaso (Markusfeld, 1987; Kaneene & Miller, 1995; Benzaquen et al., 2007; Bicalho et al., 2010; Martinez et al., 2012).

Pode haver infecção da parede uterina quando há lesões causadas pela desproporção feto-materna ou apresentação anormal do feto (Markusfeld, 1987). O trauma provocado provoca a quebra das barreiras físicas contra a infecção uterina, o que pode facilitar a adesão e invasão bacteriana (Sheldon et al., 2009; Galvão, 2013). Além disso, a intervenção humana é comum nestas situações e pode aumentar o nível de contaminação do útero e da vagina durante a extração manual do feto (Lewis, 1997; Duboc, 2010b; Bicalho et al., 2010).

Há maior risco de ocorrerem dificuldades no parto devido à existência de um feto macho (Meyer, Berger, Koehler, Thompson & Sattler, 2001). Estes estão associados a um maior peso fetal, e o aumento do peso do feto pode aumentar o risco para a distócia (Sieber, Freeman & Kelley, 1989; Duffield, Rabiee & Lean, 2008b). Bicalho et al. (2010), verificaram que o nascimento de vitelos macho aumentava 1,6 vezes a probabilidade de contaminação intrauterina por *E. coli* comparativamente ao nascimento de vitelos fêmea. No entanto, ainda não é um facto comprovado que a parição de vitelos machos seja um fator de risco para a metrite (Machado & Bicalho, 2015).

A própria gestação gemelar também é considerada um fator de risco para a metrite, o que se pode explicar pelo menor tempo de gestação e atraso na involução uterina (Markusfeld, 1987). Num estudo de Bicalho et al. (2010), as probabilidades de contaminação intrauterina de *E. coli* em vacas de leite que tiveram gestações gemelares foi 4,4 vezes maior que em vacas que pariram apenas um vitelo vivo. Os mesmos autores também relataram uma probabilidade 3,7 vezes maior de contaminação em partos com nados mortos comparativamente a partos com nados vivos.

O aborto também tem uma relação significativa com a metrite (Kaneene & Miller, 1995). A causa subjacente ao aborto pode levar a que posteriormente haja uma infecção uterina (Galvão, 2013). Poderá então ser relevante o facto de que os principais agentes implicados na patogenia da metrite, como *E.coli* e *T. pyogenes*, também podem causar abortos nos bovinos (Palmer, 2015).

4.2.2.1.2 - Retenção placentária

A retenção placentária define-se como a falha na expulsão das membranas fetais, o alanto-córion e o âmnio, passadas 12h do parto (Palmer, 2015).

A retenção placentária está frequentemente associada com a metrite, sendo considerada um dos fatores de risco mais importantes para esta doença, e as consequências negativas que causa na fertilidade também são atribuíveis à infecção uterina subsequente (Markusfeld, 1987; Kaneene & Miller, 1995; Drilliche, Pfützner, Sabin, Sabin & Heuwieser, 2003; Bicalho et al., 2010).

Entre 25 e 50% das vacas com retenção placentária acabam por desenvolver metrite (LeBlanc, 2008).

A lóquia com conteúdo necrótico, cuja presença está associada à retenção placentária, constitui um meio ótimo de crescimento para as bactérias, potenciando a infecção do útero (Sheldon et al., 2009). Tal como nos casos de partos assistidos, quando as vacas com retenção placentária são tratadas por remoção manual das membranas fetais podem haver danos causados no tecido uterino e uma maior contaminação bacteriana do útero, ficando mais predispostas para a metrite (Lewis, 1997; Parkinson, 2009). Por outro lado, a retenção placentária também causa atraso na expulsão da lóquia (Markusfeld, 1987).

4.2.2.2 - Fatores relacionados com nutrição e problemas metabólicos

4.2.2.2.1 - Cetose e o papel dos AGNE e BHB circulantes

Nas últimas semanas antes do parto, a diminuição da capacidade ruminal, o aumento da mobilização de nutrientes para o desenvolvimento fetal e as alterações endócrinas, que ocorrem neste período de transição, provocam uma diminuição da ingestão de matéria seca (IMS), acompanhada ou não de um aumento na lipólise. (Bell, 1995; Drackley, 1999; Peek & Divers, 2008).

Mais tarde, a mobilização das reservas energéticas para a produção leiteira após o parto, não acompanhada por um aumento compensatório na IMS, juntamente com as adaptações nutricionais que se fazem nos sistemas de produção levam a um estado de balanço energético negativo (BEN) (Peek & Divers, 2008; Esposito, Irons, Webb & Chapwanya, 2013).

Geralmente, a vaca leiteira é sempre sujeita a BEN no início da lactação, mantendo a produção de leite através de mecanismos como a transição para um estado de resistência à insulina (RI) (LeBlanc, 2014). Isto leva a um aumento na lipólise e consequente libertação de ácidos gordos não esterificados (AGNE) para circulação (Sordillo & Raphael, 2013). Durante este período, há um risco acrescido para ocorrência de doenças associadas com a redução da função imunitária inata, visto que o BEN e a RI contribuem para o agravamento dessa situação (LeBlanc, 2014).

O aumento dos níveis de somatotropina (GH) em circulação também é característico no pós-parto e, ao ligar-se a recetores específicos no fígado, influencia o metabolismo através do aumento da gluconeogénese, da lipólise, e dos níveis de AGNE no sangue (Knapp, Freetly, Reis, Calvert & Baldwin, 1992; Lucy, Jiang, & Kobayashi, 2001). O fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) é uma substância que regula a secreção da GH através de um mecanismo de feedback negativo. Na altura do parto, é registada uma descida nos níveis de IGF-1 em circulação, levando a um aumento da

GH circulante. Isto deve-se a uma diminuição da expressão de recetores para a GH no fígado, associada a um BEN agravado (Lucy et al., 2001).

O aumento da mobilização das reservas lipídicas e da concentração sanguínea de AGNE dificultam a β -oxidação completa destes últimos pelo fígado e a sua completa exportação dos tecidos hepáticos após re-esterificação em triglicéridos. A acumulação de triglicéridos no fígado (fígado gordo) atua como feedback negativo para a gluconeogénese, o que agrava ainda mais o BEN (Herdt, 2000; Sordillo & Raphael, 2013).

Os AGNE também podem ser convertidos no fígado em corpos cetónicos, como o β -hidroxibutirato (BHB), que em situações de maior mobilização hepática podem acumular-se, desenvolvendo-se cetose (Sordillo & Raphael, 2013).

Foram encontradas correlações positivas com a metrite com a maior perda de condição corporal no período de secagem ou com a menor IMS durante o período de transição (Kim & Suh, 2003; Hammon Evjen, Dhiman, Goff & Walters, 2006).

Em estudos recentes, verificou-se uma diminuição do risco de metrite com o aumento do IGF-1 antes do parto e aumento do risco com maiores níveis de AGNE no mesmo período (Giuliodori et al., 2013).

Em estudos mais antigos, a cetose já havia sido considerada um fator de risco para a metrite (Markusfeld, 1987; Kaneene and Miller, 1995). Suthar, Canelas-Raposo, Deniz & Heuwieser (2013) registaram uma probabilidade 1,5 vezes maior da ocorrência da doença em vacas com cetose subclínica (BHB sanguíneo ≥ 1.4 mmol/L).

Vacas com condição corporal (CC) muito elevada também têm maior risco para contrair metrite (Kaneene and Miller, 1995). Há uma tendência para os bovinos com maior pontuação de CC perderem mais peso corporal devido a uma maior mobilização lipídica no início da lactação, com maior aumento nos AGNE e BHB circulantes (Sordillo & Raphael, 2013). Nestes animais, a grande mobilização de reservas de gordura e a acumulação excessiva de AGNE em circulação são fatores importantes que explicam o aparecimento de doenças metabólicas e infecciosas nestes indivíduos (Sordillo, Contreras & Aitken, 2009).

Tanto o aumento dos níveis de AGNE como de BHB estão associados a um estado de imunossupressão durante a fase de transição (Hammon et al., 2006). No entanto, ainda não são totalmente compreendidos os mecanismos responsáveis pelo comprometimento da imunidade como consequência do BEN e dos desequilíbrios metabólicos já revistos (LeBlanc, 2014).

Scalia et al. (2006) registaram perda de viabilidade dos PMN sanguíneos de bovinos associada a altas concentrações de AGNE, que parece ter como explicação o aumento da explosão oxidativa também regulada pelos níveis de AGNE. Esta explosão oxidativa culmina na produção de espécies reativas de oxigénio (ERO) pelas células fagocíticas, importantes para a eliminação dos microrganismos invasores. (Chen & Junger, 2012).

O *stress* oxidativo, que se deve à presença em excesso de ERO, ativa uma via de inflamação próinflamatória, a NF- κ B, e aumenta a produção de TNF α pelos leucócitos mononucleares (Sordillo et al., 2009). O *stress* oxidativo também pode contribuir para a disfunção das defesas imunitárias e da

resposta inflamatória, principalmente em situações de *stress* metabólico (O'Boyle, Corl, Gandy & Sordillo, 2006; Sordillo et al., 2009).

A acumulação de ERO pode causar danos mais diretos nos tecidos. As ERO causam peroxidação lipídica, principalmente nos lípidos das membranas celulares, sendo os ácidos gordos polinsaturados (AGPS) particularmente suscetíveis. Após ocorrer oxidação, formam-se radicais lipídicos, que na presença de oxigênio levam à criação de peróxido lipídico. Este último pode iniciar uma reação em cadeia que gera mais reações de peroxidação lipídica na membrana celular. Este processo leva à destruição de membranas e organelos, afetando a função das células (Sordillo & Aitken, 2009).

Níveis altos de BHB também afetaram a atividade dos PMN nos bovinos, nomeadamente a quimiotaxia, em vacas com cetose (Suriyasathaporn et al., 1999).

O aumento dos AGNE estimula a libertação de citocinas proinflamatórias pelo tecido adiposo, enquanto os primeiros também podem ligar-se ao TLR4, iniciando a cascata inflamatória anteriormente revista, intensificando o processo inflamatório. Para além disso, os AGNE também podem afetar a atividade dos PMN (LeBlanc, 2014).

Vacas com fígado gordo têm a capacidade de resposta do sistema imunitário inato comprometida, particularmente a nível da atividade dos neutrófilos (Zerbe et al., 2000).

Por fim, Machado & Bicalho (2015) citaram de estudos anteriores que em vacas leiteiras no periparto, a supressão da atividade imunitária dos PMN, nomeadamente a capacidade de explosão oxidativa, e a metrite estão associados.

4.2.2.2.2 - Papel do IGF-1

Substâncias metabólicas como o IGF-1 e outras proteínas parecem ter propriedades imunomoduladoras no endométrio (Palmer, 2015).

O IGF-1 e o IGF-2 são ambos pertencentes ao sistema do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e participam nos processos de reparação de tecidos que são necessários para a involução uterina (Llewellyn, Fitzpatrick, Kenny, Patton & Wathes 2008). Portanto, as alterações metabólicas no pós-parto, que diminuem os níveis de IGF-1, podem comprometer os mecanismos de regeneração do endométrio no pós-parto (Machado & Bicalho, 2015).

Giuliodori et al. (2013) reportaram menor risco para o desenvolvimento de metrite em associação com IGF-1 elevado antes do parto (Giuliodori et al., 2013).

4.2.2.2.3 - Hipocalcémia

O início da lactação leva a uma mobilização e esgotamento de Cálcio (Ca) que na maior parte dos casos resulta nalgum grau de hipocalcémia na maioria das vacas leiteiras na altura do parto (Goff & Horst, 1997).

Goff & Horst (1997) propuseram que o aumento nos níveis de cortisol presentes nas vacas com hipocalcémia seria a explicação para um posterior estado de imunossupressão.

A deficiência em certos minerais e oligoelementos, entre eles o Ca, nas vacas durante o pós-parto, está associada a supressão do sistema imunitário e ocorrência de doenças uterinas (Bicalho et al., 2014).

Num estudo de Martinez et al. (2012) a probabilidade de ocorrer metrite em vacas de leite aumentava à medida que a concentração sérica de Ca diminuía nos primeiros 3 dias em leite. O risco atribuído à hipocalcémia subclínica ($\text{Ca} \leq 8.59 \text{ mg/dL}$) para a metrite puerperal foi de 91,3% (Martinez et al., 2012). No mesmo estudo, a hipocalcémia foi associada a diminuição da atividade dos neutrófilos, nomeadamente a nível da fagocitose e explosão oxidativa.

Vacas com hipocalcémia subclínica ($\text{Ca} \leq 8.59 \text{ mg/dL}$) também tiveram altas concentrações séricas de AGNE e BHB no pós-parto em comparação com vacas com níveis de cálcio normais. Estes níveis mais baixos de cálcio sérico poderão ter aumentado a mobilização de reservas adiposas (ou a situação poderá ter ocorrido no sentido inverso, já que não foi encontrada uma associação estatisticamente significativa neste estudo que indique uma relação causa-efeito num sentido ou noutro) e comprometeram a função dos neutrófilos, levando a um aumento do risco de metrite (Martinez et al., 2012).

A redução da atividade dos neutrófilos pela redução de cálcio circulante deve-se, possivelmente, ao facto de haver menor reposição de Ca citosólico, já que é necessário um aumento do mesmo para despoletar algumas funções dos neutrófilos, tais como a adesão às células endoteliais, migração, fagocitose e destruição (Cohen, 1994; Martinez et al., 2014).

A hipocalcémia também é uma causa frequente da diminuição das contrações miométricas (Kamgarpour, Daniel, Fenwick, McGuigan & Murphy, 1999). Quando isto ocorre, a acumulação de lóquia no útero resultante aumenta o risco de infeção (Földi et al., 2006).

4.2.2.2.4 - Outras deficiências minerais e vitamínicas

O Cu (Cobre) hepático e o Zn (Zinco) plasmático também sofrem um decréscimo após o parto, agravado pela hipocalcémia no caso do Zn (Goff & Stabel, 1990; Xin, Waterman, Hemken & Harmon, 1993).

Foi observada uma associação entre menores concentrações séricas de Zn, P (Fósforo), Mo (Molibdénio), e Se (Selénio) no pós-parto, com a metrite (Bicalho et al., 2014).

Numa revisão de Spears & Weiss (2008) constatou-se que a deficiência em Cu, Zn, Se ou Vitamina E pode levar a imunossupressão.

A carência em Se, vitamina E ou vitamina A (β carotenos) pode provocar problemas a nível da competência das células de defesa imunitária, aumentando assim o risco do desenvolvimento de metrite (Földi et al., 2006).

Goff & Stabel (1990) observaram um decréscimo nos níveis de vitamina E independente da presença de doenças metabólicas. Os níveis plasmáticos mais baixos registam-se, geralmente, entre 1 semana antes do parto até 2 semanas pós-parto (Speiss & Weiss, 2008).

O Se e a Vitamina E são os antioxidantes mais bem estudados no que diz respeito aos seus benefícios como suplementos na dieta das vacas de leite. Os antioxidantes contribuem para as defesas do

hospedeiro prevenindo os danos causados pela ação oxidativa das ERO. Atuam pela eliminação destas últimas ou reduzindo as biomoléculas já oxidadas (Sordillo et al., 2009).

4.2.2.3 - Paridade

Há alguma discrepância em relação à associação do número de partos com a metrite nas vacas leiteiras (Machado e Bicalho, 2015). Alguns autores apontam para um maior risco nas primíparas e menor nas vacas na segunda lactação (Markusfeld, 1987). Outros referem também um maior risco nas vacas com 3 ou mais partos (Bruun et al., 2002). A explicação prende-se com o facto das novilhas terem um maior risco de sofrer distócia, responsável por lesões uterinas e também está associada à condição corporal muito elevada quando o manejo nutricional não é adequado (Markusfeld, 1987; Meyer et al., 2001; Machado e Bicalho, 2015).

Num estudo de Lessard, Gagnon, Godson & Petit (2004) a função dos monócitos nas vacas múltiparas, medida pela produção de $\text{TNF}\alpha$, PGE_2 e óxido nítrico, estava diminuída comparativamente aquela que se observou nas primíparas. A resposta imunitária também foi mais rápida nestas últimas (Lessard et al., 2004).

A idade também pode ser vista como um fator de risco independente para a metrite, embora tenha uma relação próxima com a paridade (Brunn et al., 2002).

4.2.2.4 - Influência endócrina no periparto

Para que as defesas imunitárias do útero não atuem contra o concepto, estas são suprimidas durante a gestação. Este processo é regulado em parte pelos níveis mais altos de progesterona que se verificam neste período (Padua, Tekin, Spencer & Hansen, 2005). A progesterona também mantém o relaxamento do miométrio e a contração do cérvix (Davidson & Stabenfeldt, 2013).

No final da gestação, com a maturação do córtex das glândulas adrenais do feto, o cortisol fetal aumenta a produção do estrogénio em detrimento da produção de progesterona. O estrogénio aumenta a contractilidade do útero e permite o relaxamento do cérvix criando condições para que possa ocorrer o parto. Além disso, leva também ao aumento da libertação de $\text{PGF}_{2\alpha}$, fenómeno que inicia a fase mais crítica do parto (Davidson & Stabenfeldt, 2013).

Resumidamente, a hipótese aceite é que o padrão cíclico dos níveis de hormonas esteroides, que caracterizam as diferentes fases do ciclo éstrico, regula a capacidade dos microrganismos presentes no pós-parto afetarem o útero (Dhaliwal, Murray & Woldehiwet, 2001).

O retorno à ciclicidade ovárica após o parto influencia a capacidade de resposta imunitária do útero (Sheldon & Dobson, 2004). A metrite está associada com falha em ocorrer ovulação e fases lúteas do ciclo ovárico mais alongadas (Sheldon et al., 2008). A piómetra é uma forma de infeção uterina que normalmente ocorre quando, após a primeira ovulação pós-parto, o corpo lúteo persiste e a vaca permanece anéstrica (Stephans & Lee, 1987).

O endométrio fica mais suscetível a infeções sob o efeito predominante da progesterona do que do estrogénio (Dhaliwal et al., 2001). De facto, quando as concentrações de progesterona diminuem para

níveis basais, mesmo havendo contaminação bacteriana, os agentes presentes geralmente não têm capacidade de prevalecer sobre as defesas inatas do útero (Lewis, 2004).

Uma das principais consequências da atividade do estrogênio para a imunidade na altura do parto é o aumento do fluxo sanguíneo para o trato reprodutivo. Além disso, o estrogênio também aumenta as contrações do miométrio, a mobilização de leucócitos para o lúmen do útero, e a produção de muco no trato genital, que além de funcionar como uma barreira física também permite diluir e escoar os microrganismos contaminantes (Hussain & Daniel, 1991a; Risco et al., 2007).

As concentrações elevadas de estrogênio que se verificam durante o parto causam alterações no número das células de defesa imunitária e na proporção dos diferentes leucócitos, verificando-se neutrófilia com desvio à esquerda (Noakes, 2009).

A progesterona diminui o número de linfócitos no endométrio (Gottshall & Hansen, 1992; Padua et al., 2005). Geralmente, também diminui a produção de diversos fatores pró-inflamatórios, como o TNF α . Além disso, suprime a liberação de algumas interleucinas como a IL-8, IL-6 e IL-12, deprime a quimiotaxia para neutrófilos e linfócitos T e reduz a atividade citotóxica das células NK (Ito et al., 1994; Montes et al., 1995; Hunt et al., 1997; Par, Geli, Kozma, Varga & Szekeres-Bartho, 2003).

Enquanto ocorre a diminuição dos níveis de progesterona e aumento do estrogênio, verifica-se aumento na produção de PGF $_{2\alpha}$ e leucotrieno pelo útero (Singh et al., 2008).

Durante o ciclo éstrico dos bovinos, a PGF $_{2\alpha}$ provoca a luteólise do corpo lúteo, se este for responsivo, o que resulta na queda dos níveis de progesterona, levando ao aumento do estrogênio e a contrações do miométrio. Esta cadeia promove a reversão de infecções uterinas (LeBlanc, 2008). A PGF $_{2\alpha}$ atua também como um fator pró-inflamatório, visto que estimula a produção de citocinas que promovem a fagocitose e função linfocitária (Kelly, King & Critchley, 2001).

A PGF $_{2\alpha}$ e o leucotrieno B $_4$ (LTB $_4$) estimulam as defesas imunitárias do útero e contrariam os efeitos da progesterona (Lewis, 2004; Younger, 2016). Após alguns dias da fase do estro, a produção de PGF $_{2\alpha}$ e LTB $_4$ diminuem para níveis basais, quando as concentrações de progesterona começam a aumentar e o útero torna-se novamente suscetível a infecções (Azawi, 2008).

A PGF $_{2\alpha}$ estimulou a quimiotaxia por neutrófilos e a eliminação de bactérias pelos mesmos *in vitro*. No mesmo estudo, a LTB $_4$ promoveu a quimiotaxia, migração e citotoxicidade (Hoedemaker, Lund & Wagner, 1992).

A presença de prostaglandina E $_2$ (PGE $_2$) em circulação nas vacas com infecções uterinas por *E.coli* está associada à reação inflamatória despoletada pelo LPS quando detetado no meio uterino. As células endometriais produziram esta prostaglandina preferencialmente à PGF $_{2\alpha}$ (Herath et al., 2011) A PGE $_2$ inibiu a proliferação linfocitária *in vitro* (Seals, Wulster-Radcliffe, & Lewis 2002).

4.2.2.5 - Fatores genéticos

Ao longo dos anos, a seleção da vaca leiteira para o aumento da produção de leite parece ter levado a uma baixa na fertilidade (Berry et al., 2003). As alterações no genótipo dos animais, juntamente com os processos metabólicos que o aumento da produção leiteira exigem, explicam esta mudança (Gutierrez, Gong, Bramley & Webb, 2006).

A alta produção leiteira, baixas reservas energéticas, mobilização lipídica e cetose são conceitos todos ligados entre si (Baird, 1982; Sordillo & Raphael, 2013). Como já foi mencionado neste capítulo, estas alterações metabólicas resultantes da mobilização energética para a produção leiteira estão associadas com imunossupressão.

Na avaliação genética, a metrite, a infertilidade e a alta produção leiteira são traços combinados por terem uma relação muito próxima entre si (Pösö & Mäntysaari, 1996).

4.2.3 - Fatores relacionados com o ambiente e sistema de produção

4.2.3.1 - Condições de higiene na maternidade

O nível de higiene nas instalações, particularmente da maternidade, e durante a assistência ao parto foram indicados como um fatores que podem contribuir para a metrite, embora a sua relevância seja bem menor que aquela que se verifica nos problemas relacionados com o parto ou nas doenças metabólicas. (Kaneene & Miller, 1995; Palmer, 2015).

Como já foi dito, a involução uterina pode ser condicionada pela contaminação bacteriana ascendente após o parto. Frequentemente, a entrada destes agentes no trato genital deve-se à ausência de cuidados de higiene suficientemente eficazes durante o parto (Lewis, 1997).

Grupos alojados em maternidades com cama de palha tiveram incidência reduzida de metrite comparativamente a grupos alojados em maternidades com outro material (Kaneene & Miller, 1995). A palha, como material de cama, poderá ser mais adequada em termos higiénicos para a maternidade que a areia ou a serradura (Machado & Bicalho, 2015).

4.2.3.2 - Sistema de produção

Houve também uma menor associação de metrite com partos que sucederam em zona de pasto. Foi estabelecido que o ambiente no qual a vaca, pare quando está no pasto, é menos conspurcado e menos propenso a causar contaminação bacteriana que um meio de estabulação (Kaneene & Miller, 1995).

Palombi et al. (2013) contrariam esta ideia no seu estudo, em que não observaram quaisquer diferenças na probabilidade de ocorrerem infeções uterinas entre grupos alojados em maternidades com camas apropriadas ou alojados em locais com maior acumulação de material conspurcado.

Havia sido descoberto, anteriormente, que a utilização de instalações individuais limpas como maternidades reduzia a probabilidade de ocorrerem infeções uterinas (Huffman Mortimer, Olson, Ball & Farin, 1984). Provavelmente, isto devia-se ao facto destas instalações permitirem melhores padrões de higiene e melhores práticas de manejo na maternidade, visto que pode haver uma observação mais atenta da vaca antes, no decorrer e depois do parto (Kaneene & Miller, 1995).

No entanto, foi também feita a associação oposta, com maior incidência de metrite após os partos ocorrerem em instalações individuais. A supervisão mais cuidadosa do bovino após o parto também

permite uma maior detecção de casos de metrite ao contrário do que acontece em sistemas com agrupamento dos animais a seguir ao parto (Kaneene & Miller, 1995).

A sobrelotação leva ao aumento dos níveis de cortisol devido ao *stress* causado pela necessidade das vacas permanecerem em pé por longos períodos de tempo, estando esta alteração fisiológica associada a imunossupressão e maior suscetibilidade a infeções. (Bova et al., 2014; Kelley, Johnson & Dantzer, 1994; Munksgaard & Simonsen, 1996;).

4.2.3.3 - Tamanho do efetivo

A associação com o tipo de alojamento é também relacionada, por alguns autores, com o tamanho do efetivo, visto que as condições higiénicas durante o parto tendem a ser melhores em explorações de pequena dimensão de produção familiar do que em explorações de leite em grande escala (Kaneene & Miller, 1995; Földi et al., 2006).

4.2.3.4 - Aptidão produtiva

A incidência de infeções bacterianas no útero aumenta nas vacas de leite comparativamente às vacas de carne aleitantes (Pugh, Lowder & Wenzel, 1994).

Além das vacas de leite serem mais propensas a sofrerem com *stress* derivado da alta produção, na produção leiteira há um maior número de controlos, tanto individualmente como a nível populacional, daí que sejam observadas com mais atenção e, portanto, diagnosticadas mais facilmente. Isto também permite que estas vacas tenham um retorno mais rápido à ciclicidade ovárica, o que vai alterar as defesas imunitárias a nível uterino (Palmer, 2015).

4.2.3.5 - Estação do ano e temperatura

Uma hipótese descreve que durante os meses de Inverno, a concentração dos partos e o ambiente mais húmido e conspurcado poderá aumentar a pressão infecciosa no trato genital da vaca (Benzaquen et al., 2007). Além disso, o peso do feto tem tendência a ser maior nos partos de Inverno, favorecendo a ocorrência de distócias nesta altura (Sieber et al., 1989).

Por outro lado, nos meses mais quentes, o *stress* térmico afeta as funções fisiológicas das vacas e pode aumentar a incidência de algumas doenças como a retenção placentária e metrite puerperal (Kadzere, Murphy, Silanikove & Maltz, 2002).

Dolezel, Vecera, Palenik, Cech & Vyskocil (2008), observou um maior número de casos de metrite puerperal durante a primavera, embora isto não tenha representado uma diferença significativa em relação às outras estações do ano.

5 - Complicações clínicas

As principais complicações que podem vir a desenvolver-se num caso de metrite são a peritonite, seja ela localizada ou generalizada, infeções ascendentes do trato urinário, piosalpingite e adesões a nível da bursa ovárica. Também podem surgir pneumonias, poliartrites e endocardites, bem como abscessos por diversos órgãos caso chegue a haver septicémia (Parkinson, 2009).

Podem surgir algumas doenças metabólicas como consequência da metrite, nomeadamente a cetose e o deslocamento do abomaso à esquerda (Gröhn, Erb, McCulloch & Saloniemi, 1989; Shaver, 1997; Garro, Mian & Cobos Roldán, 2013). A perda de apetite, ou mesmo incapacidade de se levantar e comer, explicam a ocorrência de cetose secundária a metrite (Gröhn et al., 1989). O deslocamento de abomaso à esquerda ocorre principalmente nas primeiras 2 a 4 semanas pós-parto. Esta doença também tem como fator predisponente a menor ingestão no período do parto, que resulta num menor enchimento ruminal. Esta situação constitui um risco para que ocorra a migração do abomaso para a posição anormal referida (Shaver, 1997).

6 - Incidência

Num estudo de Santos et al. (2010), foram compilados dados sobre a incidência de doenças metabólicas e infecciosas nos primeiros 60 dias pós-parto, a partir de vários ensaios feitos com um total de 5719 vacas leiteiras de 7 explorações diferentes nos EUA. Enquanto que 27% dos indivíduos foram diagnosticados com apenas uma doença, 17,2% tiveram pelo menos dois casos.

A proporção de vacas numa determinada população com doença a nível uterino tem uma grande variabilidade, mesmo entre explorações geograficamente próximas que aparentam ter características semelhantes. A explicação para esta variabilidade pode residir nas diferentes características de manejo das explorações, os padrões de higiene, a produção leiteira, entre outros fatores (Palmer, 2015). Já o cálculo da prevalência média não permite obter uma informação significativa (Lewis, 1997).

A incidência da metrite parece estar a aumentar, talvez porque atualmente há uma maior consciencialização por parte dos produtores e melhor capacidade de diagnosticar esta doença, associada à utilização de *softwares* de gestão de dados que só recentemente começaram a permitir entender o verdadeiro impacto das doenças uterinas a nível económico. (Palmer, 2015).

Le Blanc et al. (2011) refere uma incidência de metrite durante a lactação de 10-20%.

A partir de outros estudos em grande escala conduzidos em Israel, Alemanha e EUA, Sheldon et al. (2009) constatou que a incidência máxima para a metrite era de 36%-50%, enquanto que a incidência para a doença com sinais sistémicos (grau 2, segundo a classificação proposta pelos mesmos autores) foi de 18,5%-21%. Utilizando a definição mais generalizadamente aceite para a doença, outros estudos levados a cabo nos EUA e Canadá em explorações de leite, na maioria de grande escala, mostraram incidências de 12%-30% para a metrite (Dubuc et al., 2010b; Santos et al, 2010; Martinez et al., 2012; Bicalho et al., 2014; Machado et al., 2014a). Já Bicalho et al. (2012), no seu estudo realizado num grupo de 111 vacas leiteiras nos EUA, registaram uma incidência de 40,5%. Na Argentina, Guillard et al (2013) encontraram uma incidência de 29,7% para metrite puerperal numa exploração com um efetivo de 1600 vacas Holstein.

Num estudo de Suthar et al. (2013), foi registada a incidência de várias doenças durante o pós-parto, entre as quais a metrite, em 5884 vacas de 528 explorações de 10 países diferentes, Portugal incluído. A incidência observada em Portugal foi de 7,2 % em 1000 vacas de 113 explorações diferentes. Neste estudo, 98% das vacas incluídas eram da raça Holstein-Frísia, 1,2% cruzadas de Holstein-Frísia e 0,8% eram Jersey, Parda Suíça, outras raças e cruzadas de todas exceto de Holstein-Frísia.

País	Número de explorações	Número de vacas	Incidência de metrite (%)
Portugal	113	1000	7,2
Espanha	100	1093	13,2
Alemanha	117	947	4,0
Itália	66	470	24,9
Hungria	24	270	13,3
Polónia	11	294	11,6
Eslovénia	24	271	4,0
Croácia	7	283	3,2
Sérvia	42	384	18,5
Turquia	24	872	3,7
Total	528	5884	9,6

Tabela 7 - Incidência de metrite puerperal em 10 países diferentes calculada a partir de amostragens de dimensões diferentes, escolhidas aleatoriamente de várias explorações distintas. Para o estudo, foi escolhida uma média de 11 vacas por exploração e um mínimo de 280 vacas por país (Adaptado de Suthar et al., 2013).

Oliveira (2011a) e Koch (2013) levaram a cabo, cada um, estudos sobre hipocalcémia em explorações localizadas nos Açores e Ribatejo, respetivamente. Ambos registaram a incidência de metrite na população de vacas que entraram nos ensaios. O primeiro realizou o seu estudo em 5 explorações diferentes na ilha Terceira, com a particularidade de duas delas basearem o sistema de produção no pastoreio. Foram incluídos 114 animais no estudo, com uma incidência de 5,3% de infeções uterinas. Koch, por sua vez registou uma incidência de 30,4% para a metrite, numa exploração de grandes dimensões, na região do Ribatejo. O estudo incumbiu um grupo de vacas recém-paridas, todas múltiparas, com exclusão de qualquer uma que tivesse sinais clínicos de hipocalcémia.

De Andrade (2013) observou uma incidência de 27 e 14%, em vacas Holstein-Frísia, em duas explorações leiteiras distintas, localizadas no centro do país. Foram incluídas aleatoriamente 35 vacas de cada exploração, todas na primeira ou segunda lactação. Ambas as explorações tinham regimes de produção intensivos.

Oliveira (2011b) registou uma incidência de 23% em 30 primíparas da raça Holstein-Frísia de uma exploração, também no centro do país.

7 - Impacto nas explorações

As infeções uterinas que ocorrem no período do pós-parto afetam a economia da exploração reduzindo a taxa de fertilidade, diminuindo a produção leiteira, aumentando os custos relacionados com os tratamentos, a taxa de refugo e a mortalidade (Sheldon & Dobson, 2004; Sheldon et al., 2009; Gilbert, 2013). Estas perdas estão associadas ainda a uma maior predisposição para outras doenças (Gilbert, 2013).

Tendo em conta as consequências negativas na fertilidade e aos custos associados ao seu tratamento, a infeção uterina das vacas leiteiras é uma das doenças que trazem maior prejuízo à indústria do leite (Sheldon et al., 2008).

O custo financeiro médio de um caso de metrite numa exploração leiteira foi calculado com um valor de 292€. O refugo dos animais afetados foi o fator com mais impacto económico nesta análise, tendo o maior custo relativo associado à metrite (Drillich et al., 2001). Foi determinado o custo anual das doenças uterinas na União Europeia, utilizando para este cálculo uma incidência de 20% para a metrite. O custo calculado foi de 1,4 biliões de euros. Nos EUA, este valor foi calculado com um valor de \$650 milhões (Sheldon et al., 2009).

7.1 - Impacto na reprodução

Numa vacaria de leite o sucesso económico está, em parte, dependente da capacidade reprodutiva dos animais (Meadows, Rajala-Schultz & Frazer, 2005).

É necessário que o trato reprodutivo esteja numa condição saudável para a capacidade reprodutiva da vaca ser satisfatória no âmbito da exploração, caso contrário é feito o refugo do animal para prevenir o prejuízo que é consequente da manutenção no efetivo de um animal com baixa eficiência reprodutiva (Palmer, 2015). As vacas que não ficam gestantes acabam por ser refugadas, e isto representa um impacto económico importante para a exploração (Brett & Meiring, 2015). Segundo Bell & Roberts (2007), estas consequências constituem o maior risco associado às infeções uterinas para as explorações leiteiras.

As infeções uterinas, sejam de expressão clínica ou subclínica, contribuem para a incidência de subfertilidade e infertilidade (Sheldon et al., 2008). A metrite sobrepõe-se à retenção placentária como fator primário na perda de eficiência reprodutiva em vacas afetadas (Sandals, Curtis, Cote & Martin, 1979).

7.1.1 - Evidência da infertilidade nos índices reprodutivos

Os índices reprodutivos mais relevantes a nível económico são os dias em aberto, intervalo entre parto, intervalo parto-1ª inseminação, taxa de conceção à primeira inseminação, taxa de conceção a todas as inseminações, taxa de deteção do cio, refugos reprodutivos por lactação e abortos (Brett & Meiring, 2015).

Segundo Roche (2006), geralmente, é preciso que o útero das vacas esteja com um bom estado de involução por volta dos 50 dias pós-parto e que mais de 90% das vacas consiga retomar a ciclicidade ovárica com ciclos normais para conseguir altas taxas de submissão à inseminação artificial.

Os dias em aberto, ou intervalo de parto-conceção, é um índice muito útil porque representa um somatório do desempenho reprodutivo em geral e, muito frequentemente, reflete a redução da fertilidade nas vacas de uma exploração (Meadows et al., 2005; Fourichon, Seegers & Malher, 2000). Para além do tempo que decorre necessariamente entre o parto e a primeira inseminação artificial, por decisão de adiar a mesma para esperar que a vaca recupere do último parto, também a taxa de deteção do estro e a taxa de conceção definem o número de dias em aberto (Barr, 1975; Fourichon et al., 2000; Brett & Meiring, 2015). Este índice tem ainda a utilidade de englobar tanto as vacas que se tornam gestantes como as que vão para refugo e não chegam a ficar prenhas (Fourichon et al., 2000).

O aumento dos dias em aberto reduz o lucro da exploração pela menor quantidade de leite produzida, menor número de novilhas de substituição disponíveis e maiores taxas de refugo reprodutivo (Oltenacu, Rounsaville, Milligan & Foote, 1981).

7.1.2 - Doença uterina e infertilidade

Num caso de infeção uterina, a fertilidade é condicionada diretamente, pela própria afeção no trato reprodutivo, e pela influência na atividade normal do eixo hipotálamo-hipofisário-ovário (Bonnett, Martin & Meek, 1993; Sheldon, Noakes, Rycroft, Pfeiffer & Dobson., 2002b; Sheldon & Dobson, 2004; Sheldon et al., 2008).

Para que possa haver a nutrição adequada do blastocisto e embrião, seguida do estabelecimento de uma gestação, é necessário que o endométrio esteja num estado saudável (Sheldon et al., 2008). A infeção do útero com bactérias patogénicas parece ter uma ação condicionante na conceção e a presença de *T. pyogenes* ou de bactérias anaeróbicas é considerado um fator de risco para redução da fertilidade (Sheldon & Dobson, 2004; Sheldon et al., 2008).

Segundo Bonnet et al. (1993), O aumento da inflamação do *stratum compactum* está associada a menor desempenho reprodutivo. O desenvolvimento do embrião e da placenta também fica comprometido se houver inflamação do endométrio, observando-se uma redução da qualidade do primeiro comparativamente ao que se observa se o crescimento ocorrer com exposição a um endométrio numa condição normal para esta fase de gestação (Hill & Gilbert, 2008).

Num estudo anterior, já referido no presente trabalho, Sheldon et al. (2000) comprovaram que havia menor crescimento folicular no ovário ipsilateral ao corno previamente gravídico e que a presença de um folículo > 8 mm em diâmetro, entre os 14 e 28 dias do pós-parto, no mesmo corno uterino estava associada com um menor intervalo do parto à conceção, portanto a melhor eficiência reprodutiva.

Esta associação entre o corno uterino e o ovário ipsilateral é ainda influenciada pela presença de corrimento vaginal purulento, o que sugere que a inflamação uterina participa neste processo. Este efeito diminui com o avançar do tempo de pós-parto, o que é também acompanhado pelo progresso na involução uterina e pela eliminação da contaminação bacteriana do útero (Sheldon et al., 2000; Sheldon et al., 2002b). Sheldon & Dobson (2004) propuseram a hipótese de que esta indicação de possíveis efeitos diretos localizados de uma infeção uterina no ovário e no crescimento folicular poderia ser causada pela resposta imunitária do útero a essa infeção. A associação específica do corno uterino previamente gravídico poderá ser explicada pelo facto de estar relativamente maior e com maior conteúdo bacteriano ou pelo facto de haver uma maior vasculatura venosa a drená-lo e a transportar uma maior quantidade de toxinas bacterianas, ou de moléculas proinflamatórias, para o ovário ipsilateral (Sheldon & Dobson, 2004).

De facto, LPS e várias citocinas proinflamatórias como a IL-1 ou TNF α inibem a secreção de GnRH pelo hipotálamo e a capacidade de resposta da hipófise aos pulsos de GnRH, levando a um atraso na foliculogenese após o parto (Bosu, Peter & DeDecker, 1988; Battaglia, Krasa, Padmanabhan, Viguié & Karsch, 2000; Williams, Harris, Battaglia, Viguié & Karsch, 2001).

No entanto, embora uma relação tenha sido relatada em estudos com outros mamíferos, a contaminação uterina e as endotoxinas resultantes da infeção bacteriana não surtiram qualquer efeito

nos níveis plasmáticos de FSH e na emergência de novas ondas foliculares (Battaglia et al., 2000; Sheldon et al., 2002b). De qualquer forma, as endotoxinas inibem a libertação pulsátil de LH pela hipófise, através da interferência na ação da GnRH, referida anteriormente (Sheldon & Dobson, 2004). Através de estudos em ovelhas, descobriu-se que a interferência na secreção pulsátil de GnRH e LH é mediada também pelo aumento dos níveis de cortisol e prostaglandinas, resultante da ação das endotoxinas (Karsch, Battaglia, Breen, Debus & Harris, 2002).

No estudo de Sheldon et al. (2002b), com a maior contaminação do útero, o crescimento do folículo dominante foi mais lento e, na fase final, secretou menos estradiol. O mesmo efeito, causado por LPS e TNF α , foi mais recentemente confirmado em estudos *in vitro*, em que estes suprimiram a secreção de estradiol pelas células da granulosa. Estes dois intervenientes, quando injetados no útero de vacas de produção leiteira, inibiram a ovulação em algumas delas (Williams et al., 2008). De facto, as infeções uterinas no pós-parto atrasam o período da ovulação e a retoma da ciclicidade ovárica após o parto (Opsomer, 2000; Gilbert, 2013).

A metrite também leva ao prolongamento da fase lútea após o parto, o que pode diminuir as taxas de concepção (Opsomer, 2000; Galvão, 2013).

Quando os folículos ovulatórios foram detetados antes dos 10 dias do pós-parto, os ciclos ováricos procedentes foram normais ou mais alongados, ao contrário do que aconteceu no caso dos folículos dominantes terem sido detetados após o dia 20, em que os ciclos ováricos resultantes foram sempre mais curtos que o normal (Savio, Boland & Roche, 1990). A produção e libertação de PGF $_{2\alpha}$ pelo endométrio dita a longevidade do corpo lúteo, que por sua vez determina a maior ou menor duração do ciclo (Thatcher et al., 1984). Savio et al., (1990) propuseram que afeções a nível do endométrio e deficiência em PGF $_{2\alpha}$ poderiam ser a causa da persistência anormal do corpo lúteo e prolongamento do ciclo ovárico (Savio, 1990).

A falha na regressão do corpo lúteo pode ser causada por uma redução dos níveis de estradiol produzido pelo folículo dominante, não ocorrendo libertação de PGF $_{2\alpha}$ do endométrio (Peter, Vos & Ambrose, 2009; Wiltbank, Gümen & Sartori, 2002; Davidson & Stabenfeldt, 2013).

Por outro lado, devido à resposta inflamatória e alterações patológicas resultantes, as infeções no útero causam um atraso na involução uterina, o que está associado a uma maior libertação de PGF $_{2\alpha}$ (Leslie, 1983; Williams et al., 2005). De facto, nas vacas em que isto acontece, o retorno à ciclicidade ovárica é atrasado (Ptaszynska, 2009). A maior libertação de PGF $_{2\alpha}$ contribui para o prolongamento do período anovulatório em vacas com doença uterina no pós-parto, visto que é necessário que a PGF $_{2\alpha}$ desça para níveis basais para que a progesterona possa estar elevada (Opsomer, 2000). Como já foi explicado no primeiro capítulo do presente trabalho, é importante a redução da sensibilização do hipotálamo ao estradiol pela progesterona, para que ocorra o retorno ao ciclo éstrico.

O aparecimento de uma fase lútea brevemente a seguir ao final da involução uterina leva à ocorrência de um maior número de ciclos éstricos antes de ser feita a primeira inseminação, o que está associado a maior fertilidade (Lamming & Darwash, 1998). No entanto, em vacas com infeção no útero, a ocorrência de uma ovulação pode levar à piómetra. (Palmer, 2015).

Santos et al. (2010) registaram uma menor probabilidade das vacas terem voltado a ciclar aos 65 dias pós-parto quando afetadas com metrite ou endometrite clínica. O efeito isolado destas doenças no

retorno à ciclicidade éstrica foi mais marcado que o efeito de outras doenças observadas nos primeiros dias de lactação, como os problemas relacionados com o parto, mastite, claudicação e pneumonia. Estas doenças também reduziram a taxa de concepção à 1ª IA e aumentaram o risco de morte embrionária e aborto nos primeiros 60 dias de gestação (Santos et al., 2010).

É importante salientar aqui que os atrasos no recomeço da ciclicidade estão associados a uma redução da taxa de concepção e da taxa de fertilidade, levando a um aumento dos dias em aberto (Rhodes, 2003). De facto, publicações recentes referem esta descida na taxa de concepção devida à metrite (Overton & Fetrow, 2008; Giuliadori et al., 2013). Maizon et al. (2004) referiram que vacas com metrite puerperal tiveram mais dias em aberto.

A influência na atividade normal do eixo hipotálamo-hipofisário-ovário também pode ocorrer de forma indireta, quando a doença uterina faz aumentar o BEN com as consequências que lhe estão associadas (Opsomer, 2000; Wiltbank et al., 2002; Roche, 2006). A IMS pode deprimir significativamente caso se desenvolva uma doença clínica, levando o animal a um estado de BEN (Opsomer, 2000).

Em situações de subnutrição e BEN, poderá haver uma inibição na produção de FSH, fenómeno que suprime o crescimento folicular (Wiltbank et al., 2002). Neste caso, ocorre um anestro de tipo I. Poderá também haver diminuição na frequência do pulso de LH, devido a um aumento do feedback negativo causado pelo estradiol no hipotálamo, que poderá estar mais sensível a este efeito (Wiltbank et al., 2002; Peter et al., 2009). Esta situação ou a supressão dos pulsos de GnRH são apontados como outras possíveis causas de anestro do tipo I (Peter et al., 2009).

O BEN também podem levar ao anestro de tipo II, caracterizado por desvio da onda folicular e crescimento dos folículos, ao que se segue atresia e regressão, sem que o folículo dominante, caso chegue a existir, atinja o tamanho pré-ovulatório (Wiltbank et al., 2002; Peter et al., 2009). Também neste caso, destaca-se a importância de um maior efeito de feedback negativo nos pulsos de GnRH e LH pelo estradiol, em relação ao que acontece em vacas a ciclar normalmente (Wiltbank et al., 2002). No primeiro capítulo desta revisão bibliográfica foi referida a importância de IGF-1 na promoção do crescimento folicular. Realça-se o que já foi referido atrás, que um estado grave de BEN leva à diminuição da expressão de recetores para a GH no fígado e, conseqüentemente, à descida nos níveis de IGF-1 em circulação (Lucy et al., 2001).

Num estudo em vacas leiteiras, os animais que perderam mais condição corporal durante os primeiros 65 dias pós-parto tiveram maior probabilidade de permanecer anéstricas, tiveram menor taxa de concepção e um maior risco de morte embrionária e aborto (Santos, Rutigliano, Sá Filho, 2009).

Menor percentagem média de proteína na formulação dietética durante os primeiros 55 dias de lactação estiveram ligados a um aumento no risco de ovulação tardia (Opsomer, 2000).

Como já foi mencionado, o BEN pode causar um aumento na lipólise e libertação de AGNES para a circulação, com desenvolvimento de cetose (Sordillo e Raphael, 2013). No estudo de Santos et al. (2010), a cetose também foi indicada como um fator relevante no prolongamento do anestro pós-parto, menor taxa de concepção à 1ª IA e aumento do risco de morte embrionária e aborto nos primeiros 60 dias de gestação.

7.2 - Impacto na produção leiteira

Embora quedas na produção média diária de leite possam ser um parâmetro utilizado para diagnosticar metrite clínica, a associação entre infecções uterinas e produção leiteira é variável segundo os estudos feitos na matéria (Fourichon, Seegers, Bareille & Beaudeau, 1999, Bell & Roberts, 2007; LeBlanc, 2008; Duboc, et al., 2011).

Bell & Roberts (2007) demonstraram que infecções uterinas em vacas leiteiras estavam relacionadas com menor IMS, menor teor proteico no leite e menor produção leiteira. De facto, a redução da IMS nas vacas afetadas com infecção uterina pode levar à diminuição da energia disponível para a produção de leite (Giuliodori et al., 2013).

Fourichon (1999) constata que não houve qualquer efeito da metrite na produção leiteira em 8 dos 10 estudos revistos pelo mesmo autor. Os restantes demonstravam uma perda na produção de 100 a 270 Kg.

No estudo de Santos et al. (2010) as doenças infecciosas diagnosticadas nos primeiros 60 dias pós-parto, entre as quais a metrite e a endometrite, não influenciaram a produção leiteira na mesma lactação, e a produção aos 305 dias em leite foi similar entre as mesmas vacas e as saudáveis.

Se não houver uma comparação com a produção prévia ou potencial das vacas, os mesmos estudos poderão estar a omitir uma associação negativa das infecções uterinas com a produção leiteira, já que a metrite é mais frequente em vacas de alta produção (Fourichon et al., 1999).

A produção em vacas primíparas não foi alterada devido a doenças uterinas no estudo de Duboc et al. (2011), e os resultados foram mais variáveis em vacas múltiparas. Provavelmente relacionado com pior estado de saúde dos animais e menor produção leiteira nas primeiras semanas de lactação, houve um maior risco de refugo em múltiparas devido à metrite num estudo de Wittrock, Proudfoot, Weary & von Keyserlingk (2011). Estes autores relataram que, nas primíparas, não houve diferenças na IMS, produção leiteira e taxa de refugo relativamente às vacas saudáveis. O facto das primíparas doentes manterem a IMS e terem uma resposta imunitária mais rápida, pode explicar a ausência de uma redução na produção de leite e de um aumento na taxa de refugo (Lessard, Gagnon, Godson & Petit, 2004; Wittrock, et al., 2011).

8 - Diagnóstico

Os sinais clínicos que os bovinos evidenciam quando desenvolvem infecções no útero variam com a virulência do agente (ou agentes) causativo da doença e com a influência dos fatores predisponentes que podem estar presentes (Azawi, 2008). Não existe nenhum método *gold standart* para o diagnóstico de doença uterina (Sheldon et al., 2006; de Boer et al., 2014). Devido a isto, torna-se complicado avaliar qual a melhor decisão clínica a tomar (Sheldon et al., 2006). Nas vacarias de leite, deve haver um conjunto de procedimentos, claramente padronizados, em relação a quando examinar as vacas para determinar a presença de metrites e como identificá-las (Galvão, Risco & Santos, 2011b).

8.1 - Sinais clínicos e palpação retal

O diagnóstico da metrite é baseado essencialmente na detecção de sinais clínicos (Sheldon et al., 2006). Em primeiro lugar é necessário um exame do estado geral do animal, incluindo a sua atitude, a avaliação do estado de hidratação e a temperatura retal (TR), que deve ser avaliada sempre antes de se recorrer à palpação retal. Segundo a definição de Sheldon et al. (2008), a TR revela um estado de hipertermia se os seus valores forem superiores a 39,5 °C. Para além disto, o corrimento proveniente do útero deve ser examinado pelo método de palpação retal para que o diagnóstico de infeção uterina possa ser definitivo (Földi et al., 2006). No entanto, quando o exame é feito antes dos 15 dias pós-parto, este método não permite distinguir evidentemente entre o estado de involução do útero numa situação de pós-parto normal e num estado afetado por uma condição anormal (Dolezel et al., 2008).

Num estudo de Sheldon, Rycroft & Zhou (2004), a pirexia foi associada, por métodos estatísticos, com a contaminação do útero por agentes patogénicos, nomeadamente *Prevotella* spp., e com um aumento significativo dos níveis plasmáticos de proteínas de fase aguda (α 1 - glicoproteína ácida). No entanto, este sinal clínico não demonstrou ser um bom indicador da carga bacteriana presente em infeções uterinas. Embora a pirexia não deixe de ser um indicador de inflamação, são necessários outros sinais clínicos para identificar a doença que está presente (Sheldon et al., 2004). Benzaquem et al. (2007) reportaram a subida dos valores de TR em vacas leiteiras, com início 2 dias antes do diagnóstico de metrite puerperal, baseado no estado geral e nas características do corrimento vaginal. A pirexia, definida neste estudo por TR > 39,4° C, não foi observada na maior parte das vacas com metrite puerperal, o que revela que a metrite não é necessariamente acompanhada de pirexia. No mesmo estudo, após o tratamento das vacas com metrite puerperal, a TR desceu para níveis semelhantes aos registados nas vacas sem a doença, não sujeitas a qualquer tratamento.

O período do pós-parto durante o qual são identificados os sinais clínicos e o corrimento fétido, aquoso e de cor castanho avermelhado, proveniente do útero, são suficientes para o diagnóstico da metrite, independentemente da presença de sinais sistémicos (Földi et al., 2006; Sheldon et al., 2009).

Para além da febre, os sinais clínicos sistémicos associados à metrite são a perda de apetite, depressão, prostração, relutância em se levantar, queda na produção leiteira, taquicardia, taquipneia e diarreia, que pode levar a desidratação (Sheldon et al., 2006; Földi et al., 2006; Parkinson, 2009). Estes sinais ocorrem menos frequentemente nas vacas com metrite e estão associados à libertação excessiva de mediadores inflamatórios e produtos da infeção bacteriana, como as endotoxinas (Földi et al., 2006).

O estadio final de uma metrite toxémica pode ser semelhante a uma hipocalcémia clínica devido à relutância da vaca em se levantar quando está recumbente. Nesta fase, poderá também já haver descida da temperatura corporal devido à toxemia avançada (Noakes, 2009).

Os sinais sistémicos ocorrem maioritariamente nos casos de metrite causados por distócia ou retenção placentária (Dolezel et al., 2008).

No caso da endometrite, como já foi mencionado na definição da doença, os sinais clínicos manifestam-se pela presença de um corrimento purulento após os 21 dias pós-parto ou mucopurulento após os 26 dias pós-parto (Sheldon et al., 2006). Segundo LeBlanc (2002b), um diâmetro cervical superior a 7,5 cm, a partir do 21º dia pós-parto, também é uma característica indicativa de endometrite. Para provocar a expulsão do corrimento pela vulva de modo a ser

examinado, pode ser feita uma massagem no corpo do útero, cérvix e na vagina anterior (Hillman & Gilbert, 2008).

As características do corrimento proveniente do útero estão associadas à densidade da população bacteriana que contribui para a contaminação uterina, mas também à gravidade da infecção (Kulcsár et al., 2005; Williams et al., 2005). Na metrite tóxica, o corrimento surge fétido ainda antes dos 3 - 4 dias pós-parto. Em casos mais ligeiros, isto ocorre mais tarde, entre os 6 - 10 dias pós-parto (Kulcsár et al., 2005).

A parede uterina poderá encontrar-se com uma espessura reduzida e atonicidade ou hipotonicidade, associada a um conteúdo intrauterino anormalmente aumentado, devido a incapacidade da sua expulsão pelo útero (Földi et al., 2006; Hillman & Gilbert, 2008). Em casos de metrite tóxica, este aumento do diâmetro uterino poderá estar associado a fisómetra, ou seja, presença de gás no interior do útero, podendo ser confundido com o ceco distendido (Hillman & Gilbert, 2008). Por outro lado, outros casos podem revelar uma parede mais espessada devido ao processo inflamatório e presença de edema, havendo nestes casos menos conteúdo intrauterino anormal (Földi et al., 2006).

No entanto, há uma diferença entre casos de diferentes níveis de gravidade em relação ao tempo em que os sinais característicos surgem. Isto pode levar ao aparecimento de falsos negativos, por exemplo quando é detetado corrimento vaginal fétido em vacas que tiveram anteriormente distócia e/ou retenção placentária. Nestas situações, a avaliação da involução uterina poderá ser feita mais cedo que o habitual (Földi et al., 2006). Além disso, a involução uterina varia individualmente devido aos diversos fatores, para além das infeções uterinas, que influenciam a mesma (Dolezel et al., 2008). De referir também que a avaliação da involução uterina pela palpação retal é sempre um método subjetivo (LeBlanc et al., 2002).

Isto também é válido para o diagnóstico da endometrite, visto que, normalmente, quando é feita a palpação às 3-5 semanas pós-parto, o diâmetro uterino ainda está aumentado, havendo sempre alguma variação individual, mesmo nesta fase (Földi et al., 2006).

8.2 – Exame vaginal

Normalmente, o exame direto da vagina não é realizado por rotina, no entanto, poderá ser utilizado como um método de apoio ao diagnóstico quando uma vaca tem hipertermia de causa desconhecida e não é possível extrair corrimento do útero, mesmo após a palpação retal (de Boer et al., 2014). Dolezel et al., (2008), num estudo sobre um programa de controlo para a metrite puerperal, considerou a palpação vaginal com avaliação da lóquia, ao dia 10 ± 3 pós-parto, um método diagnóstico com precisão suficiente para esta doença.

Segundo Hillman & Gilbert (2008), a palpação vaginal, precedida da limpeza do períneo, é essencial para a obtenção de um diagnóstico completo, uma vez que permite diferenciar a metrite de vaginites ou cervicites. Os cuidados de higiene também devem passar pela lavagem da vulva com uma solução antisséptica, como povidona iodada, e pelo uso de uma luva de palpação limpa e bem lubrificada (Williams et al., 2005).

O conteúdo purulento na vagina também pode ser observado por vaginoscopia, recorrendo a um vaginoscópio de plástico ou metal esterilizável ou em papelão descartável, ou através da introdução e retração do Metrichcek (Simcrotech, Hamilton, Nova Zelândia), uma vareta de aço inoxidável com uma

ponta de borracha em hemisfério, representado na Figura 3 (LeBlanc et al., 2002; Sheldon et al., 2006; McDougall, Macaulay & Compton, 2007). Este último é considerado um método mais rápido e sensível a detetar corrimento purulento que a vaginoscopia, embora sejam sempre necessários os cuidados de higiene devidos antes da sua introdução no trato genital da vaca (McDougall et al., 2007).

8.3 – Ultrassonografia

A ultrassonografia também pode ser utilizada como método de diagnóstico para infeções uterinas, visto que permite examinar o tamanho do útero, a espessura da parede uterina e a presença de membranas fetais e gás no lúmen (Azawi, 2008; Hillman & Gilbert, 2008).

No diagnóstico da piómetra, apesar de haver fecho funcional do cérvix, pode não haver oclusão total do lúmen e ocorrer passagem de algum corrimento a nível da vagina. Pela ultrassonografia, pode ser observado um corpo lúteo persistente no ovário e o lúmen uterino está aumentado e repleto dum fluido de ecogenicidade mista (Sheldon et al., 2006).



Figura 3 - Corrimento purulento extraído, através do Metricheck, do cérvix de uma vaca nas primeiras semanas do pós-parto. Esta vaca foi diagnosticada com metrite (Original).

8.4 – Bacteriologia

Considera-se que a análise bacteriológica uterina não representa uma mais-valia para o diagnóstico das infeções uterinas já que os achados no início do pós-parto são semelhantes em condições normais e situações patológicas (Zilaitis Banys, Maruska & Ziogas, 2004 citado por Dolezel et al., 2008). Isto é apoiado pelos dados referentes à contaminação bacteriana no pós-parto, apresentados por Sheldon et al. (2009), já antes referidos no quarto capítulo, e por um estudo de Deguillaume (2011), que demonstrou uma ausência de associação significativa entre agentes patogénicos uterinos e o grau de inflamação no útero. No entanto, Williams et al. (2005) associou espécies específicas, como *E. coli*, *T. pyogenes*, *F. necrophorum*, *M. haemolytica* e *Proteus* spp. com exudados de diferentes características.

A recolha por zaragatoa e por escova endometrial são atualmente considerados os métodos mais adequados para obter amostras para identificação das bactérias contaminantes no útero (Williams et

al., 2007; Green, Ledger, Berg, Peterson & Back, 2009; Dolezel et al., 2010; Wang, Ametaj, Ambrose & Gänzle, 2013).

8.5 – Citologia

A técnica da escova endometrial também pode ser utilizada para recolher amostras para exame citológico. Este tem por base a avaliação da resposta celular, nomeadamente dos neutrófilos, numa inflamação ativa (Kasimanickam et al., 2004; de Boer, 2014).

As amostras para citologia também podem ser obtidas por lavagem uterina ou aspiração do fluido cervical (Gilbert, Shin, Guard, Erb & Frajblat, 2005; Yavari, Hagkhah, Ahmadi, Gheisari e Nazifi, 2009). A lavagem uterina permite a colheita de áreas maiores do que no método da escova endometrial. No entanto, há uma diferença no tipo de amostra colhida em ambas as técnicas. No segundo método é possível separar algumas células endometriais e inflamatórias da mucosa uterina, já a lavagem colhe uma quantidade proporcionalmente maior de células livres no lúmen uterino (de Boer, 2014).

Considera-se que uma percentagem de neutrófilos de 5-8% entre a contagem total de leucócitos e células endometriais numa lâmina de citologia endometrial, feita às 4-5 semanas pós-parto, já indica um nível de inflamação indesejável (LeBlanc, 2011). Gilbert et al. (2005) definiram um valor *cut-off* de 5% como critério de diagnóstico para a endometrite subclínica.

8.6 - Histopatologia

A inflamação do tecido endometrial também pode ser detetada a partir de análises histopatológicas conseguidas por biópsia (Bonnet et al., 1991).

Na metrite, as camadas afetadas surgem com edema, infiltração leucocitária e degeneração do miómetro (Sheldon et al., 2006). Durante a fase aguda, a serosa adquire uma coloração mais escura, granular, com petéquias e fibrina (McGavin e Zachary, 2009).

Já na endometrite, além de infiltração celular por neutrófilos, ocorrem alterações superficiais que variam de descamação de algumas células a necrose tecidual. Caso se trate de uma afeção leve, as alterações no endométrio não são detetáveis visualmente. Tratando-se de uma endometrite mais grave, pode haver edema da mucosa, podendo apresentar uma superfície rugosa com adesões de fibrina e tecidos necrosados. As endometrites mais graves geralmente evoluem para o estado crónico e o tecido necrótico é substituído por tecido de granulação sem glândulas, que mais tarde dá lugar a tecido fibroso (McGavin e Zachary, 2009).

Ao mesmo tempo, a biópsia também pode ser utilizada para obter culturas bacterianas (Bonnet et al., 1991). No entanto, este é um método mais caro, demorado, invasivo e com problemas de fertilidade associados à sua realização (Bonnett et al., 1993; Dolezel et al., 2008)

8.7 - Outros métodos de diagnóstico auxiliares

Para diagnosticar infeções uterinas também podem ser feitos testes indiretos, através da medição de parâmetros sistémicos. Foram estabelecidas associações com a ultrapassagem de valores *cut-off* para esses parâmetros, tais como a hematologia (aumento do hemograma (Ht), Contagem de Eritrócitos

(RBCC) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) aos 21 dias pós-parto e aumento de contagem de leucócitos (WBCC) e da concentração de neutrófilos, monócitos e eosinófilos aos 42 dias pós-parto), bioquímica (redução das proteínas totais (PT) e albumina, medição de proteínas de fase aguda (concentração de haptoglobina > 0,8 g/L na primeira semana pós-parto), citocinas (aumento da expressão de TNF α , CXCL5, IL1 β , IL6 e IL8), AGNE e BHBA (concentrações elevadas no início do pós-parto podem estar associadas a endometrite subclínica) (Green et al., 2009; Duboc et al 2010b; Fischer, Drillich, Oda, Heuwieser, Einspanier & Gabler, 2010; Galvão, Santos, Galvão & Gilbert, 2011a; Senosy, Izaïke e Osawa, 2012).

Apesar de se encontrarem associações relevantes nestes testes, ainda não é bem compreendida a direção da casualidade relativamente aos parâmetros medidos e à doença uterina. A título de exemplo, o aumento dos níveis de proteínas de fase aguda pode resultar diretamente da inflamação do trato reprodutivo, mas também pode contribuir para o condicionamento das defesas imunitárias, quando despeletado por alguma inflamação sistémica, podendo levar indiretamente à inflamação do trato reprodutivo (de Boer et al., 2014).

Uma tendência possível no desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico para as doenças uterinas é a pesquisa de biomarcadores reprodutivos e sistémicos no sangue ou no leite (Boer, 2014).

Um novo aparelho utilizado para detetar as alterações odoríferas no corrimento vaginal quando está presente uma infeção no trato genital, o nariz elétrico, mostrou resultados promissores (Burfeind et al., 2014).

9 - Tratamento

O tratamento das infeções uterinas em bovinos visa não só a salvaguarda da vida e do bem-estar do animal, mas também o melhoramento da sua eficácia reprodutiva e o retorno a um nível de produção aceitável para o produtor (LeBlanc, 2008; Dubuc et al., 2011).

Nas explorações de grande dimensão, é essencial que, para um tratamento adequado das doenças uterinas, haja uma monitorização sistemática das vacas após o parto, o que permite diagnosticar os casos ainda em tempo de os tratar eficazmente (Földi et al., 2006).

Para LeBlanc (2014), é possível que uma estratégia de espera antes de ser feito qualquer tratamento, para permitir a cura espontânea, seja uma hipótese a considerar em estudos posteriores. No entanto, uma terapêutica eficaz para infeções uterinas deve eliminar os agentes patogénicos existentes no útero, evitando longos intervalos de segurança para o leite e para a carne (Azawi, 2008).

O tratamento mais precoce possível da endometrite é aconselhado, já que está associada ao risco de se desenvolver piómetra ou outros efeitos negativos na fertilidade futura da vaca (Hussein & Daniel, 1991b). No entanto, esta doença pode ser auto-limitante, se a atividade éstrica normal for estabelecida, com um sistema imunitário funcional e nutrição adequada (Hillman & Gilbert, 2008).

Os métodos terapêuticos direcionados para as infeções uterinas passam pela utilização de antibióticos, antissépticos, hormonas e a terapia de suporte quando esta for necessária, dependendo do estado geral da vaca (Parkinson, 2009)

9.1 - Antibioterapia

A utilização de antibióticos para tratar as metrites e endometrites pode ser feita recorrendo-se à via sistémica ou localmente, por administração direta no lúmen do útero (Gilbert, 2013; LeBlanc, 2014).

A recolha de amostras bacteriológicas para realização de testes de sensibilidade é rara, já que normalmente, antes de haver conhecimento dos resultados já terá sido tomada uma decisão acerca do tratamento, para além do custo dessa testagem não se justificar a maior parte das vezes (Risco et al., 2007).

Para que a antibioterapia possa ter eficácia a nível do útero, é importante que o fluido presente seja extraído (Azawi, 2008). A lavagem uterina antes da administração de antibióticos intrauterinos aumenta a eficácia do tratamento (Hillman & Gilbert, 2008). No entanto, nas metrites tóxicas, o útero encontra-se friável e pode ser facilmente roturado ao ser tentada uma lavagem uterina, tal como a sua manipulação pode resultar em bacteriémia. Por esta razão, nestes casos, poderá ser uma boa decisão começar a remoção manual do conteúdo do útero após o início da antibioterapia (Gilbert & Schwark, 1992).

9.1.1 - Antibioterapia sistémica

Atualmente, o tratamento da metrite baseia-se na administração sistémica de antibióticos (LeBlanc, 2014). Também há algumas indicações para o tratamento da endometrite pela via sistémica (Azawi, 2008).

Esta via de administração é particularmente importante quando a metrite tem repercussões a nível sistémico (Hillman & Gilbert, 2008). Além disso, quando ocorre metrite tóxica, a invasão microbiana chega às camadas mais profundas da parede uterina (Azawi, 2008). A administração sistémica é necessária para atingir as concentrações terapêuticas em todos os tecidos do trato reprodutivo, mesmo nestas camadas mais profundas (Bretzlaff, 1987).

A principal desvantagem desta via de administração é o facto de nem sempre se conseguir atingir a concentração mínima inibitória contra os agentes patogénicos uterinos, já que os níveis do princípio ativo no tecido uterino nunca serão maiores que aqueles que se verificam na corrente sanguínea (Földi et al., 2006).

9.1.2 - Antibioterapia intrauterina

A terapia por via intrauterina é o principal método terapêutico para a endometrite (Azawi, 2008).

O princípio ativo escolhido por esta via deve ter um largo espetro de ação e tem de ser eficaz no meio anaeróbio presente no útero. Por esta última razão não podem ser utilizados os aminoglicosídeos. As sulfonamidas não são eficientes na presença de conteúdo resultante da necrose dos tecidos, pelo que também não podem ser utilizadas (Bretzlaff, 1987).

Pela revisão de trabalhos anteriores, Dolezel et al., (2008), aponta a oxitetraciclina, tetraciclina, ampicilina em associação com cloxacilina, gentamicina e cefapirina como os princípios ativos mais frequentemente utilizados nas infusões de antibióticos para o tratamento local de infeções uterinas.

O tratamento indicado como o mais eficaz para a endometrite é a administração intrauterina de uma fórmula de cefapirina (Metricure, Merck Animal Health) (Gilbert, 2013).

Este tipo de terapia com antibióticos por via intrauterina tem as seguintes desvantagens (Dhaliwal, 2001; Hillman & Gilbert, 2008; Von Krueger, Scherpenisse, Roiger & Heuwieser, 2013):

-) Diluição ou inativação do fármaco - nos casos mais graves de metrite ou quando há presença de grandes quantidades de fluido no lúmen uterino, um único tratamento intrauterino tem um efeito desprezível devido à diluição do fármaco, para além de que este pode perder as suas propriedades antimicrobianas pela influência do material purulento, da atividade dos agentes produtores de betalactamase e pelo efeito do ambiente anaeróbio;
-) Lesão da mucosa – As tetraciclina têm um efeito irritante no endométrio;
-) Intervalo de segurança no leite – Mesmo que a absorção pela mucosa uterina não seja tão eficiente nesta fase do pós-parto, foi demonstrado que a administração intrauterina diária de oxitetraciclina poucos dias após o parto, em vacas com retenção placentária, levou ao aparecimento de níveis elevados deste antibiótico no leite durante 4 dias depois do último tratamento;
-) Farmacocinética não adequada – As concentrações destes fármacos no útero não se mantêm consistentemente acima dos níveis desejados para tratar a metrite;
-) Efeitos negativos na imunidade – A administração intrauterina de antibióticos também suprime a função dos neutrófilos, o que pode agravar ainda mais o problema se os agentes presentes no útero forem resistentes ao antibiótico utilizado.

9.1.3 - Princípios ativos

Os antibióticos escolhidos devem ter atividade contra os principais agentes patogénicos uterinos (Azawi, 2008).

Atualmente, as tetraciclina e as cefalosporinas são os antibióticos mais frequentemente utilizados no tratamento das infeções uterinas. A sua eficácia é difícil de avaliar pela revisão da literatura existente porque os autores não só utilizam doses e formulações diferentes, como também fazem os ensaios clínicos em explorações com características e condições de produção diferentes (Malinowski et al., 2009).

9.2.3.1 - Penicilinas

A penicilina já foi o antibiótico de eleição para o tratamento da metrite no pós-parto. Uma das razões da sua preferência prende-se com o facto de penetrar todas as camadas teciduais da parede uterina (Smith & Risco, 2002). Além disso, acreditava-se historicamente que a maioria dos agentes patogénicos nas metrites, capazes de causar septicémia, eram suscetíveis à ação da penicilina. (Paisley, Mickelsen & Anderson, 1986).

Num estudo de Malinowski et al., (2009) foram isoladas por zaragatoa, do útero de vacas com metrite, estirpes de *E. coli* sensíveis à amoxicilina associada com ácido clavulânico. Este estudo também demonstrou que a mesma formulação foi aquela à qual estirpes de *T. pyogenes*, isoladas das mesmas vacas, mostraram maior sensibilidade, a seguir ao ceftiofur. Além disso, foi verificado que amoxicilina associada com ácido clavulânico e fluoroquinolonas tinham uma alta atividade antimicrobiana *in vitro* contra *T. pyogenes* e *E. coli* isoladas do corrimento destas vacas.

A administração intrauterina de penicilina não é recomendada devido à alta probabilidade de existência de bactérias produtoras de betalactamase (Paisley et al., 1986; Azawi, 2008).

9.2.3.2 - Tetraciclina

As tetraciclina têm um espectro de ação amplo e são eficazes mesmo na presença de pus e em anaerobiose (Bretzlaff, 1987).

Goshen & Shpigel (2006) verificou que um tratamento com clortetraciclina foi muito eficaz no tratamento de metrite e preveniu os efeitos negativos desta doença na eficiência reprodutiva e na produção leiteira.

Desde há muito tempo que a oxitetraciclina tem sido utilizada para tratar casos de metrite, sendo utilizada principalmente pela via intrauterina (Bretzlaff, 1987; Földi et al., 2006). De facto, a administração intrauterina de oxitetraciclina leva à acumulação de concentrações terapêuticas nas carúnculas e no endométrio das vacas tratadas. A sua atividade também é praticamente confinada ao lúmen uterino, já que a sua passagem para a corrente sanguínea é reduzida (Roncada, Ermini, Schleuning, Stracciari & Strocchia, 2000).

Apesar da oxitetraciclina ser muitas vezes utilizada na prática comum, e ter sido também o agente mais utilizado para o tratamento da metrite no passado, não representa a escolha terapêutica mais eficaz porque existe alguma resistência a este antibiótico, tendo sido verificada a concentração mínima inibitória (CMI) mais elevada para diversas estirpes de *E. coli* e *T. pyogenes* isoladas de vacas com metrite, de entre outras escolhas de substância ativa, tais como a enrofloxacin, a cefquinoma e o ceftiofur (Sheldon, Bushnell, Montgomery & Rycroft, 2004).

9.2.3.3 - Cefalosporinas

Num estudo de Sheldon et al. (2004b), as cefalosporinas demonstraram estar associadas a CMI muito baixas, nomeadamente a cefapirina, cefquinoma e ceftiofur.

Desde há alguns anos que as cefalosporinas de terceira e quarta geração são testadas como boas hipóteses de tratamento para as infeções uterinas. Estes fármacos têm propriedades farmacocinéticas ideais para o tratamento pretendido em vacas leiteiras, com intervalos de segurança curtos para o leite e carne (Földi et al., 2006).

O ceftiofur pertence à terceira geração de cefalosporinas e é muito eficaz contra quase todas as bactérias gram-positivas e gram-negativas patogénicas (Salmon, Watts & Yancey, 1996). O uso deste princípio ativo na Europa foi aprovado para o tratamento da metrite com uma utilização de 5 dias consecutivos (Von Krueger et al., 2013).

Ao contrário daquilo que acontece com a penicilina G procaína e com a oxitetraciclina, a formulação de ceftiofur hidrocloreto não provoca o aparecimento de resíduos no leite e na carne quando utilizado de acordo com a dosagem recomendada (Risco & Hernandez, 2003; Palmer, 2015). Atualmente, a administração sistêmica do ceftiofur é o tratamento geralmente preferido para a metrite (Galvão et al., 2011b; McLaughlin et al., 2012; 2013; Von Krueger et al., 2013). Guilidori et al. (2013), verificaram num ensaio, que incluía o tratamento de vacas com metrite com ceftiofur, que este fármaco melhorou a fertilidade dos animais, mesmo que não tenha sido encontrada uma associação significativa com a cura da doença. A razão para o sucesso deste medicamento nesta perspectiva é o facto de ser também eficaz no tratamento das mastites, laminite e doença respiratória bovina. A menor resposta curativa ao tratamento com ceftiofur pode ter sido causada por uma duração inadequada do tratamento, feito em 3 dias em vez dos 5 recomendados (Guilidori et al., 2013).

Para além do ceftiofur hidrocloreto, têm sido utilizadas outras formulações para o tratamento da metrite, tais como o ceftiofur sódico e o ceftiofur ácido livre cristalino (Galvão et al., 2011b). Este último foi aprovado recentemente para a utilização no tratamento da metrite (CVMP, 2011). No entanto mantém uma concentração no organismo acima da CMI durante 5 dias, tendo sido preferido como a primeira opção no tratamento da doença em muitas explorações devido ao seu longo período de atuação (Galvão et al., 2011b).

Após um tratamento de 3 dias com 1 mg/kg de peso corporal de ceftiofur hidrocloreto, as concentrações deste fármaco foram detetadas acima da CMI no soro, lóquia, endométrio, carúnculas e cotilédones. Estas concentrações mantiveram-se durante 24 horas após a última administração (Drillich et al., 2006).

Num estudo recente de Lima et al. (2014) um tratamento para a metrite com ampicilina triidratada teve efeitos semelhantes aos do ceftiofur hidrocloreto na taxa de cura.

9.3.4 - Outras Infusões intrauterinas

A administração de antissépticos, tais como a solução de Lugol ou a clorexidina, provocam irritação e necrose química no endométrio (Hillman & Gilbert, 2008). Mesmo assim, a utilização de solução de Lugol como infusão intrauterina pode ter utilidade no tratamento de endometrite (Hussein & Daniel 1991b). Esta formulação tem sido utilizada juntamente com oxitetraciclina para casos específicos de endometrite crónica que já apresentassem um útero completamente involuído, tónus da parede uterina fraco, inatividade ovárica e com pouco corrimento, embora ainda com características anormais. Nestes casos, o feito irritante destas infusões na mucosa levam à libertação de prostaglandinas do útero, que podem despoletar o início da ciclicidade ovárica, permitindo o aumento dos mecanismos de defesa natural do trato reprodutivo (Hillman & Gilbert, 2008).

De referir, porém, que as infusões de antissépticos no útero, para além do efeito irritante referido, já demonstraram causar alguma inibição da função fagocitária das células de defesa imunitária localmente (Paisley et al., 1986).

Também já foram feitos ensaios com imunomoduladores administrados por via intrauterina, nomeadamente LPS bacteriano de *E. coli*. Este tratamento parece aumentar a contagem de PMN, no útero, devido a uma estimulação dos mecanismos de defesa inata (Singh, Sidhu, Dhaliwal, Pangaonkar, Nanda & Grewal, 2000).

9.3.5 - Terapia hormonal

A utilização de hormonas permite estimular a expulsão do corrimento uterino e permite uma melhor atuação das defesas naturais do útero.

De uma forma geral, aquelas que são utilizadas na terapêutica da metrite podem ser divididas em dois grupos: hormonas que atuam diretamente no útero e hormonas que induzem o estro ou um estado com características semelhantes no trato reprodutivo. Enquanto que no primeiro caso se inclui a oxitocina, no segundo caso é considerada a prostaglandina e o estrogénio (Pulfer & Rise, 1991).

A administração de estrogénio em animais de exploração é proibida na Europa (Diretiva 81 /602/CEE, 1981). Por essa razão, este trabalho não irá descrever o uso desta opção terapêutica. No entanto, convém referir que tem como princípio a já referida modulação das defesas naturais a nível do útero pelo estrogénio e características da fase do estro (Bretzlaff, 1987; Hussain & Daniel, 1991a; Risco et al., 2007).

9.3.5.1 - PGF_{2α}

Um dos tratamentos que tem sido mais utilizado para as infeções uterinas, particularmente para as endometrites, é a utilização de PGF_{2α} exógena, que continua a ser alvo de estudos relativos à sua atuação no âmbito destas doenças (Dhaliwal et al., 2001; Lewis, 2004; Galvão et al., 2011b; Palmer, 2015; Younger, 2016). A injeção de PGF_{2α} também é o tratamento utilizado para a piómetra bovina (Sheldon et al., 2008).

Já foi referido neste trabalho que esta hormona não só estimula as defesas imunitárias, como é um agente luteolítico natural nos ruminantes. Isto permite que as fêmeas com um corpo lúteo presente, quando tratadas, entrem em estro, o que remove o efeito supressor do sistema imunitário causado pela progesterona, e por outro lado estimula a imunidade devido ao efeito do estrogénio. O aumento das contrações miométriais, que faz parte desta cadeia de acontecimentos, pode ajudar a evacuar o útero dos agentes contaminantes presentes no lúmen. Este mecanismo, juntamente com uma maior drenagem linfática do útero, permitem que os casos de endometrite sejam resolvidos pelo tratamento com PGF_{2α} (Dhaliwal et al., 2001).

Num estudo de Younger (2016), o tratamento de vacas leiteiras com PGF_{2α} exógena aumentou a proliferação de neutrófilos no útero e reduziu a carga bacteriana.

Além dos efeitos referidos, a PGF_{2α} tem a vantagem de ser segura e não ter intervalo de segurança para o leite (Azawi, 2008; Hillman & Gilbert, 2008).

No entanto, a eficácia desta hormona, quando administrada muito cedo no pós-parto, é duvidosa devido à menor probabilidade de um corpo lúteo funcional estar presente, segundo Hillman & Gilbert (2008). Na opinião deste autor, é preferível esperar, pelo menos, até aos 8 dias pós-parto para fazer este tratamento.

9.3.5.2 - Oxitocina

A oxitocina tem um efeito análogo ao da PGF_{2α} (Hillman & Gilbert, 2008). A primeira é particularmente útil para aumentar as contrações uterinas, se houver uma influência suficientemente forte de

estrogênio no útero (Risco et al., 2007). Além disso, também contribui para um efeito acrescido de PGF_{2α} porque a oxitocina estimula a sua secreção pelo útero. Consequentemente, há uma maior libertação de oxitocina do corpo lúteo, que induz uma maior secreção de PGF_{2α} do endométrio (Dhaliwal et al., 2001).

9.3.6 - Terapêutica de suporte

No caso de uma vaca afetada numa situação de maior gravidade, não só a desidratação mas também o risco da doença se complicar com peritonite, justificam a utilização de fluidoterapia endovenosa, já que uma peritonite extensa pode levar a anorexia completa (Risco et al., 2007; Hillman & Gilbert, 2008). Dependendo do grau de desidratação, poderá estar indicada a administração oral ou endovenosa de uma solução poliônica não alcalinizante (Risco et al., 2007; Credille et al. et al., 2014).

A utilização de anti-inflamatórios não esteroides (AINE), como a flunixin meglumina, tem por base a redução da endotoxemia, a analgesia e a recuperação do apetite (Risco et al., 2007; Hillman & Gilbert, 2008). A administração destes fármacos deve ter sempre em atenção a sua dose e duração devido à toxicidade abomasal e renal que lhes está associada (Hillman & Gilbert, 2008).

10 - Prevenção

O manejo das vacas gestantes durante o período pré-parto influencia a melhor ou pior condição do útero (Bisnotto et al., 2012). Para além de algumas medidas ou intervenções de manejo específicas para prevenir a ocorrência da metrite, existem outras recomendações que visam beneficiar a saúde geral do animal no periparto, permitindo ao mesmo tempo a prevenção desta doença (LeBlanc et al., 2011).

A atenção aos padrões de higiene das instalações e às condições higiénicas de todo o manejo dos animais no periparto é um exemplo de uma abordagem preventiva muito importante para reduzir a incidência das infeções uterinas numa exploração (Lewis, 1997).

Com base no conhecimento atual da etiopatogenia das infeções uterinas, pode ser afirmado que o objetivo primordial da prevenção destas doenças é o suporte e manutenção dos mecanismos de defesa imune inata. Isto permite reduzir o risco da contaminação e inflamação do útero, natural dos primeiros dias pós-parto, evoluir para metrite (LeBlanc et al., 2011).

10.1 - Maneio nutricional

As estratégias utilizadas para reduzir os efeitos negativos na saúde das alterações metabólicas características do pós-parto passam por uma formulação dietética adequada para minimizar o grau e extensão do balanço energético negativo, já apontado anteriormente como um fator de risco para a metrite (Bisnotto et al., 2012).

Geralmente e em termos práticos, as condições normais de manejo das explorações leiteiras passam pela utilização de forragens de menor qualidade na alimentação das vacas no período seco (Michal et al., 1994).

A redução da IMS durante o período de transição e as alterações dietéticas súbitas durante a passagem do período seco para a produção são fatores cujo impacto no agravamento do BEN pode ser atenuado por diversas estratégias. O encurtamento do período seco, e o fornecimento de concentrado e de uma dieta baixa em fibra durante o mesmo, mantidos durante a lactação, evita a mudança da dieta típica do período seco para uma dieta mais energética e com menores níveis de fibra no período de lactação. Desta forma, uma dieta mais energética e um rúmen mais adaptado para aproveitar o substrato energético, que contribui para aumentar a IMS, permite que, no início da lactação, o menor aporte energético para a vaca não seja um fator com um impacto tão grande a nível do metabolismo e saúde (Rastani et al., 2005).

No entanto, a alteração do aporte calórico durante o período pré-parto pode influenciar as alterações do metabolismo da vaca após o parto no sentido de causar uma maior mobilização lipídica, com maior acumulação de triglicéridos no fígado (Douglas, Overton, Bateman, Dann & Drackley, 2006; Bisnotto et al., 2012).

Para minimizar os efeitos negativos desta cadeia de acontecimentos pode adaptar-se a formulação da dieta pré-parto para restringir o teor energético (Bisnotto, 2012).

Por outro lado, a suplementação com colina protegida da degradação ruminal no período de transição já foi utilizada como um método para reduzir a acumulação de triglicéridos no fígado, já que esta pode aumentar a exportação de lipoproteínas hepáticas, tendo diminuído também a ocorrência de cetose em estudos recentes (Piepenbrink & Overton, 2003; Lima, Sá Filho, Greco & Santos, 2012).

Outra estratégia para melhorar a saúde metabólica dos ruminantes é o uso de ionóforos, como a monensina. Esta molécula inibe seletivamente o crescimento das bactérias gram positivas no rúmen, levando a uma alteração da flora ruminal com um aumento na produção de propionato, em detrimento à produção de acetato e butirato, como consequência (Duffield, Rabiee & Lean, 2008a; Bisnotto, 2012). Isto resulta num incremento da gluconeogénese hepática, reduzindo assim a mobilização lipídica e os níveis de AGNE e corpos cetónicos no sangue (Duffield et al., 2008a). Numa metanálise de Duffield et al. (2008b) verificou-se que a administração de monensina em cápsulas de libertação pulsátil reduzia a incidência de metrite.

A suplementação com ácidos gordos essenciais, como o ácido linoleico, pode reforçar os mecanismos de defesa imunitária do útero. Este último é um precursor do ácido araquidónico, presente nas membranas celulares, a partir do qual é sintetizada a $\text{PGF}_{2\alpha}$. A suplementação com produtos ricos em ácido linoleico, como os sais de cálcio do óleo de cártamo, tem o potencial de criar um estado pro-inflamatório durante o pós-parto, que ativa o sistema imunitário e pode ajudar a aumentar a resposta de fase aguda e a produção de citocinas, bem como melhorar a função das células de defesa imunitária (Silvestre et al., 2011).

A prevenção da hipocalcémia também é importante para evitar doenças uterinas no pós-parto, já que é um fator de risco importante devido aos efeitos supressores que causa a nível do sistema imunitário, sendo atualmente utilizadas diversas estratégias para melhorar a homeostase do cálcio nas vacas leiteira (Bisnotto et al., 2012).

Por fim, a suplementação com minerais e vitaminas também tem um efeito preventivo para as infeções uterinas (Michal et al., 1994; Bicalho et al., 2014). De facto, os níveis de minerais no organismo podem

influenciar a ocorrência destas doenças devido ao seu papel benéfico para os processos fisiológicos, o metabolismo energético e o sistema imunitário (Bicalho et al., 2014).

Também já foi referido neste trabalho, os efeitos negativos no sistema imunitário associados às carências minerais e vitamínicas. Estas podem ser evitadas pela suplementação antes do parto (Bicalho et al., 2014).

O método mais comum para fornecer minerais e vitaminas nas explorações de bovinos leiteiros é a suplementação na dieta, normalmente em prémix adicionado ao TMR. Porém, durante o período de transição, em que o fornecimento destes nutrientes se torna mais crítico, pode recorrer-se à injeção dos minerais e vitaminas (Abuelo, Hernandez, Benedito & Castillo, 2014).

A administração subcutânea de um suplemento de Zn, Mn (Manganês), Se e Cu no último trimestre da gestação reduziu a presença de géneros de bactérias patogénicas do útero aos 35 em leite, tais como *Trueperella* spp. e *Fusobacterium* spp. (Machado et al., 2012).

A suplementação da dieta de vacas de leite, no período seco, com vitamina A e β carotenos aumentou a proliferação de linfócitos e a atividade fagocitária, e diminuiu a incidência de metrite (Michal et al., 1994).

O fornecimento de antioxidantes também é importante na prevenção da metrite, atuando por dois meios: o próprio efeito antioxidante e a estimulação da resposta imunitária (Speiss & Weiss, 2008; Sordillo et al., 2009; Abuelo et al., 2014). O Se e a Vitamina E são os antioxidantes mais bem estudados no que diz respeito aos seus benefícios como suplementos na dieta das vacas de leite. Estes suplementos contribuem para as defesas do hospedeiro prevenindo os danos causados pela ação oxidativa das ERO. Atuam pela eliminação destas últimas ou reduzindo as biomoléculas já oxidadas (Sordillo et al., 2009).

O aumento dos níveis de Se melhora a capacidade de adesão dos neutrófilos em vacas e é possível que melhore a capacidade de eliminar as bactérias invasoras (Cebra et al., 2003). A vitamina E parece melhorar a imunidade essencialmente pela promoção da atividade dos neutrófilos, da quimiotaxia e da produção de interleucinas (Speiss & Weiss, 2008).

10.2 – Antibioterapia como prevenção

Esta estratégia baseia-se na redução da carga bacteriana patogénica do útero no período logo a seguir ao parto para diminuir o risco de metrite. Podem ser aplicados métodos de seleção de animais em maior risco para ser feito um tratamento metafilático para as infeções uterinas (LeBlanc et al., 2011).

O efeito de uma injeção de ceftiofur ácido livre cristalino na população de agentes anaeróbicos, *E. coli* e *T. pyogenes* em vacas com alto risco de contrair metrite foi testado num ensaio por Duboc et al., (2011). A incidência de metrite não reduziu de forma geral, embora tenha sido verificada uma menor incidência nas vacas com distócia e gemelaridade no parto como fatores de risco presentes.

No entanto, para além da problemática relativa ao tratamento das infeções uterinas com antibióticos, já referida e que será posteriormente descrita com maior pormenor, também não é recomendada a utilização destes como tratamento preventivo (LeBlanc et al., 2011).

10.3 - Vacinação

A imunologia aplicada é uma área de estudo que tem tido muitos progressos no âmbito da veterinária na última década, em parte devido a uma crescente necessidade, por parte dos veterinários e produtores, de obter resultados de ensaios clínicos que comprovem a eficácia de novas vacinas (LeBlanc, Lissemore, Kelton, Duffield & Leslie, 2006; Lee et al., 2012).

A área das vacinas de uso veterinário constitui uma pequena parte do mercado global de produtos médicos para animais, embora tenha vindo a crescer com a evolução tecnológica no desenvolvimento de vacinas, com a emergência de novas doenças e com o aumento das resistências dos agentes patogénicos a métodos terapêuticos (Meeusen, Walker, Peters, Pastoret & Jungersen, 2007). No entanto, diferentemente do que acontece na clínica de pequenos animais, o principal objetivo da vacinação em bovinos leiteiros é o melhoramento geral da produção, com o limite de utilização definido pela relação custo-benefício da utilização da vacina (Lee et al., 2012).

10.3.1 - Princípios de imunização por vacinação

O objetivo primordial da vacinação é a estimulação da atividade do sistema imunitário contra os agentes patogénicos causadores da doença que se pretende prevenir, tais como agentes bacterianos, virais, fúngicos ou parasitários (Zepp, 2016). Para isso, despoleta a chamada imunização ativa, um processo conseguido pela exposição de um indivíduo não imunizado a um agente patogénico, influenciando os mecanismos de defesa de forma semelhante a uma infeção natural (Owen, Punt & Stranford, 2009; Zepp, 2016). Ao contrário daquilo que ocorre na imunização passiva, esta permite a manutenção da imunidade a longo prazo devido à estimulação da função dos sistemas de defesa do próprio indivíduo (Owen et al., 2009).

Apesar das vacinas atuarem no sistema imunitário adaptativo, os antígenos vacinais devem ser sempre reconhecidos pelas células do sistema imune inato. O sistema imunitário adaptativo reconhece os antígenos, ou seja componentes de material estranho ao organismo capazes de despoletarem uma resposta imunitária específica pelas células de defesa, e inicia essas mesmas respostas que eliminam os agentes patogénicos responsáveis pela infeção, atuando de uma forma mais rápida que o sistema imune inato (Owen et al., 2009; Leo, Cunningham & Stern, 2011). Nestas respostas imunitárias ocorre diferenciação de células de memória, que permitem uma atuação mais rápida e eficaz sempre que, mais tarde, o mesmo agente invadir o organismo do hospedeiro (Leo et al., 2011). Estas diferenças na atuação destes dois tipos de respostas estão representadas na Figura 4.

A componente celular do sistema imunitário adaptativo são os linfócitos capazes de reconhecer antígenos. Estes são os linfócitos B, que se desenvolvem inicialmente na medula espinal, e os linfócitos T, que começam o seu desenvolvimento no timo. Os primeiros conseguem produzir anticorpos específicos para o antígeno reconhecido. As células T incluem diferentes tipos de linfócitos com funções regulatórias ou efectoras, que se baseiam na secreção de citocinas ou na eliminação direta de células infetadas por agentes intracelulares. A maioria dos antígenos e vacinas são capazes de iniciar respostas pelas células B e T (Zepp, 2016).

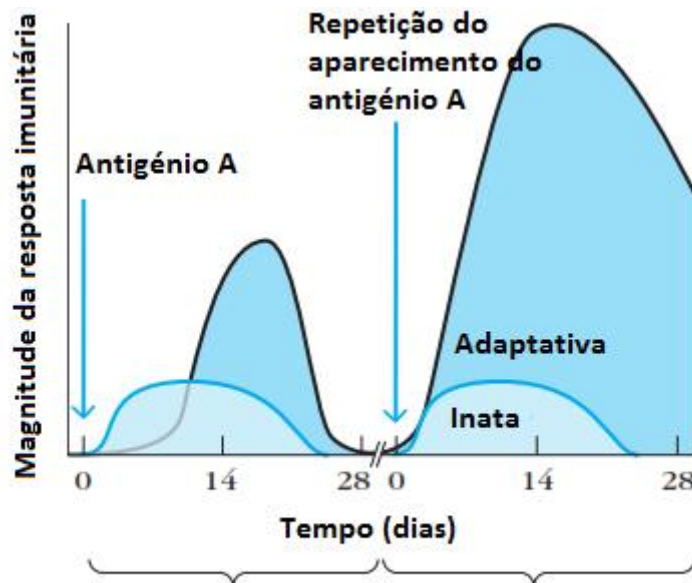


Figura 4 - Diferenças na resposta imunitária a uma primeira e a uma segunda exposição a um determinado antígeno injetado num animal (Antigénio A), demonstrando o fenómeno de memória imunitária (adaptado de Owen et al., 2009).

Algumas das células B diferenciam-se em plasmócitos, capazes de produzir grandes quantidades de anticorpos, libertados no sangue e nos outros fluidos corporais, a chamada resposta humoral (Owen et al., 2009; Zepp, 2016). Através da ligação aos antígenos específicos, os anticorpos facilitam a fagocitose do material invasor pela opsonização, permitem a eliminação dos agentes patogénicos pela eliminação mediada pelo complemento ou neutralizam toxinas (Plotkin, 2008; Singh et al., 2008; Zepp, 2016).

A fração constante da molécula de anticorpo pode pertencer a um de cinco isotipos diferentes, denominados de imunoglobulinas, a IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Geralmente, no início da resposta imunitária, os plasmócitos produzem IgM (Zepp, 2016). Mais tarde, a produção de anticorpos muda para o isotipo IgG, o principal componente da resposta humoral pelas células B de memória (Deenick, Hasbold, & Hodgkin, 2005). Determinadas circunstâncias determinam a ativação das células B para produzir IgA, secretado para as mucosas, ou IgE, indicado principalmente para auxiliar na defesa imunitária contra infeções parasitárias (Deenick et al., 2005; Zepp, 2016).

A característica mais importante da imunidade é a capacidade de estabelecer uma resposta de memória. Esta permite uma reação ao antígeno que demora apenas cerca de dois dias a estabelecer-se, enquanto que demoraria entre 10 a 14 dias num primeiro contacto. Além disso, previne eficazmente a reinfeção pelo mesmo agente mais tarde. Numa segunda exposição, a resposta adaptativa induz a diferenciação de células T e B de memória, com a produção de altos níveis de anticorpos (Zepp, 2016).

Provavelmente, a maioria das vacinas conferem a sua proteção através da indução do aumento dos títulos de anticorpos neutralizantes no sangue e nas mucosas, bloqueando a infeção presente, eventualmente interferindo na invasão sistémica (Plotkin, 2008).

As vacinações utilizadas para a prevenção de algumas das principais doenças bacterianas a nível do trato reprodutivo, tais como a brucelose, haemofilose e campilobacteriose, provocam um aumento nos títulos de anticorpos, que pode servir de base para testar a eficácia da imunização (Corbeil, 1999).

10.3.2 - Imunossupressão a nível dos anticorpos naturais na patogenia da metrite

Machado et al. (2014b) sugerem que a redução dos níveis de anticorpos naturais em circulação é um fator importante que contribui para um sistema imune inato mais débil na altura do parto e maior risco de ocorrer metrite. Num estudo realizado por estes autores, observou-se uma incidência reduzida de metrite e endometrite associada a maiores níveis sorológicos de anticorpos. Além disso, quando se verificava o contrário, redução dos anticorpos circulantes, havia maior presença do fator de virulência de *E. coli*, *fimH*, aos 2 ± 1 dias em leite.

Isto leva a crer que os anticorpos são uma componente importante na proteção da saúde uterina e contribuem para uma menor contaminação do útero por *E. coli* fimbriada após o parto, permitindo uma menor incidência de infeções uterinas (Machado et al., 2014b). Machado et al. (2014a) reforçaram esta ideia quando, após ter verificado uma redução significativa da incidência de metrite ao testar vários métodos de vacinação subcutânea contra agentes patogénicos uterinos, observaram um aumento nos níveis sanguíneos de anticorpos.

No entanto, é possível que os anticorpos não contribuam necessariamente para um menor risco de doença uterina, mas possam ser biomarcadores que permitam avaliar o estado imunitário na altura do parto (Banos et al., 2013).

10.3.3 - Tipos de vacinação utilizados para doenças bacterianas

Muitas das vacinas bacterianas existentes já incorporam princípios tecnológicos antigos, não deixando de ser muito eficazes (Meeusen, 2007).

Todos os métodos de produção utilizados para estas vacinas partem da realização de uma cultura num meio adequado ou outros meios de preparação possíveis (Lee et al., 2012). Geralmente, pode considerar-se a seguinte classificação (Liljeqvist & Ståhl, 1999; Mielcarek, Alonso & Loch, 2001; Clark & Cassidy-Hanley, 2005; Meeusen, 2007; Tran, Quessy, Letellier, Desrosiers & Boulianne, 2010; Lee et al., 2012):

) Vacina viva atenuada – Conseguída a partir do enfraquecimento da competência patogénica das bactérias utilizadas, através de manipulação genética e atenuação, ainda que estas ainda consigam infetar e multiplicar-se no hospedeiro vacinado (Mielcarek et al., 2001; Lee et al., 2012). Os genes de regulação e aqueles que estão associados a fatores determinantes da virulência ou biossíntese são os melhores alvos para o primeiro método. A atenuação pode ser conseguida por passagens seriadas em vários meios suplementados com uma proporção adequada de um químico que provoque mutações nas bactérias, alterando a sua capacidade de causar doença (Lee et al., 2012). No entanto, na maior parte dos casos, não é conhecido o método de atenuação utilizado na produção destas vacinas (Meeusen, 2007).

) Vacina morta inativada – Produzida a partir de culturas bacterianas inativadas (bacterinas) por diversos métodos, tais como inativação térmica ou química (Trane et al., 2010; Lee et

al., 2012). Embora os agentes patogénicos não se possam replicar nesta situação, mantêm a capacidade de despoletar reações imunitárias por parte do hospedeiro (Lee et al., 2012). Geralmente, estas vacinas são constituídas por bacterinas de uma ou mais espécies ou serotipos bacterianos (Meeusen, 2007).

) Vacina de subunidade – Estas vacinas contém uma fração do agente contra o qual se quer conferir proteção. Desta forma a resposta imunitária será dirigida apenas para o componente utilizado na vacina. A produção é feita a partir do isolamento de um fator imunogénico (proteínas, péptidos ou polissacáridos purificados) do agente, que é apresentado como um antigénio. A seleção dos fatores a serem isolados é feita por métodos genéticos, bioquímicos e moleculares (Lee et al., 2012). Quando são identificados genes específicos para a expressão destes fatores, são utilizados sistemas de expressão de proteínas recombinantes, tais como *E. coli* ou leveduras, para os obter. A imunogenicidade, um ponto fraco neste tipo de vacina, pode ser reforçada pelas características do próprio adjuvante ou pela utilização de um sistema de transporte que facilite o reconhecimento do antigénio e influencie a resposta pelas células do sistema imunitário (Clarck & Cassidy-Hanley, 2005). Podem até ser utilizados agentes vivos como transportadores de antigénios de subunidade, o que permite uma maior resposta imunitária celular. Os agentes bacterianos utilizados para este fim podem ser vivos atenuados ou bactérias comensais das mucosas onde se pretende que estas se repliquem (Liljeqvist & Ståhl, 1999).

Muitas vacinas atenuadas ou inativadas têm sido utilizadas em medicina veterinária desde há décadas, como método profilático contra doenças bacterianas (Meeusen, 2007).

As vacinas atenuadas oferecem a vantagem de induzir respostas imunitárias mais duradoras e amplas, já que o hospedeiro é exposto a vários estádios de replicação do agente bacteriano, para além de requererem menores doses do agente para serem aplicadas (Zapp, 2010; Lee et al., 2012). Por outro lado, as vacinas inativadas, para além de não terem o risco de ativação da patogenicidade do agente nem de transmissão do mesmo (o mesmo se verifica nas vacinas de subunidade), apresentam a vantagem de serem mais facilmente produzidas na perspetiva técnica (Zapp, 2010).

As vacinas de subunidade, por sua vez permitem a maior tolerância pelo hospedeiro de entre todas estas formas de vacinação, devido à etapa de purificação dos antigénios (Lee et al., 2012). No entanto, estas vacinas têm uma fraca imunogenicidade, como já foi anteriormente mencionado, devido à apresentação de menos antigénios e menor interação com o sistema imunitário comparativamente às vacinas que utilizam a estrutura toda do agente (Zepp, 2010).

10.3.4 - Auto-vacinas e vacinas e de rebanho

As auto-vacinas são produzidas a partir de microrganismos isolados de animais doentes para serem aplicadas mais tarde nesses mesmos animais (Nawrotek, Czernomysy-Furowicz, Borkowski, Fijałkowski & Pobuciewicz, 2012). Caso a aplicação destas vacinas se destine a um grupo de animais de uma exploração pecuária, passa a denominar-se vacina de rebanho (Carvalho, 2007). A esta estratégia vacinal dá-se o nome de vacinação autógena (Weiss, Hartmann, Nolte & Sonntag, 2003).

Estas vacinas começaram por ser utilizadas como um recurso alternativo no tratamento de doenças crónicas, recorrentes ou mesmo agudas (Nolte, Morscher, Weiss & Sonntag, 2001). Na década passada registou-se um aumento progressivo da utilização destas vacinas em Portugal (Carvalho, 2007).

10.3.4.1 - Produção de vacinas de rebanho

Estas vacinas podem ser produzidas pelas instituições veterinárias locais com meios para isso ou por empresas especializadas, a pedido das explorações para casos específicos nas mesmas, para os quais não estejam disponíveis vacinas comerciais (Meeusen, 2007).

As vacinas autógenas são sempre inativadas. A preparação destas vacinas com agentes bacterianos é feita a partir de extratos e/ou toxinas bacterianas (Carvalho, 2007).

Após a cultura do agente, os microrganismos são inativados por um agente que os modifica quimicamente, podendo utilizar-se um banho-maria a 80 °C durante 2 horas e formaldeído a 0,3% (Weiss, Bertl & Geßler, 1998 citado por Nolte et al., 2001). De seguida, é necessário assegurar que houve uma inativação eficaz de todas as bactérias, através da realização de culturas em incubação durante alguns dias. Depois a cultura é centrifugada para concentrar os agentes bacterianos e remover o agente inativante, ao que se segue a sua ressuspensão num soluto apropriado, de modo a obter a diluição de cultura que se pretende para a vacina (Carvalho, 2007). Pode ser adicionado o óleo ou hidróxido de alumínio como adjuvante (Meeusen, 2007).

Uma questão importante em relação à produção destas vacinas é o facto de ser necessário sempre um diagnóstico clínico e bacteriológico rigoroso para garantir que os organismos causadores da doença sejam aqueles que se estão a ser isolados para preparar a vacina (Carvalho, 2007).

10.3.4.2 - Vantagens da utilização de vacinas de rebanho

Comparativamente aos tratamentos convencionais, as vacinas de rebanho apresentam as seguintes vantagens (Nolte et al., 2001):

-)] Podem ser produzidas e distribuídas normalmente sem a necessidade de aprovação pelo governo, ao contrário do que acontece com as vacinas comerciais;
-)] Podem ser utilizadas como método metafilático, ou seja além de poderem ser aplicadas num contexto de prevenção nos animais saudáveis, também podem ser administradas naqueles que já estão infetados pelo agente para o qual se pretende vacinar, tendo assim uma função terapêutica. As vacinas convencionais, por outro lado só são utilizadas para profilaxia;
-)] São específicas da estirpe bacteriana que se utiliza para a sua produção, permitindo imunizar para infeções causadas por agentes para os quais ainda não existe nenhuma vacina disponível no mercado.

10.3.5 - Vacinas para metrite

No início da década passada, Nolte et al. (2001) realizou um ensaio clínico em 90 vacas leiteiras com uma vacina de rebanho que incluía *T. pyogenes*. Esta estratégia de vacinação demonstrou ser um método eficaz no tratamento de vacas com metrite recorrente no pós-parto, com recuperação de 78% dos animais doentes 6 semanas após a administração das vacinas de rebanho. Estas também foram associadas a uma melhoria da eficiência reprodutiva do efetivo vacinado (Nolte et al., 2001).

Mais recentemente, partindo do pressuposto que a metrite é uma doença de etiologia multifatorial, Machado et al. (2014a) testou uma vacina inativada polivalente em vacas leiteiras no último trimestre de gestação para conferir proteção para esta doença, utilizando *E. coli*, *T. pyogenes* e *F. necrophorum* como agentes vacinais. Com a administração por via parentérica, a vacinação reduziu significativamente a incidência de metrite após o parto no grupo testado (Machado et al., 2014a). O autor sugere a possibilidade de produção de uma vacina comercial para prevenir a metrite, tendo a base deste investimento a possibilidade de reduzir os custos associados à doença e diminuir a utilização de antibióticos e a redução do risco de resistências associado à mesma.

De facto, a criação de estirpes bacterianas resistentes aos antibióticos utilizados no gado não é uma matéria de investigação recente e tem levado a uma crescente preocupação relativa ao assunto e à necessidade de se utilizarem novos métodos de tratamento e prevenção das infeções uterinas, tais como a utilização de compostos que possam fortalecer a imunidade do hospedeiro (Lewis, 2004; Younger, 2016).

As administrações diárias de antibióticos necessários para o tratamento dos casos de metrite requerem boas condições de manejo na exploração (McLaughlin, 2012). Von Krueger et al. (2013) reportaram um estudo em 113 explorações leiteiras nos EUA que demonstrava a falha em completar o protocolo dos tratamentos com antibióticos em 76% das explorações a que foi possível obter a resposta a esta questão.

Numa conferência realizada recentemente, Vallat (2016) urgiu para a investigação e desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de antibióticos para a prevenção e tratamento de doenças infecciosas em todo o mundo, tal como a vacinação.

Uma questão que pode ter contribuído para os produtores não terem começado a optar por este método preventivo consistentemente, desde há mais tempo, é a ausência de garantias de segurança, eficácia e potência destas vacinas, ao contrário do que se verifica nas comerciais. O carácter urgente da utilização das vacinas de rebanho e a inviabilidade económica da realização dos estudos necessários leva a que estes parâmetros não sejam testados para as mesmas (Carvalho, 2007).

II – Tema: Testagem de vacina de rebanho numa exploração de leite

1 - Objetivos do trabalho

Com o estudo referido neste trabalho, pretendeu-se testar a eficácia de uma vacina de rebanho contra a metrite numa exploração de bovinos de leite, produzida a partir de culturas conseguidas de amostras intrauterinas retiradas de animais afetados na mesma exploração. Também foi testada a eficácia da mesma vacina na prevenção do desenvolvimento de doenças associadas com a ocorrência de metrite, tais como a cetose e o deslocamento do abomaso à esquerda. Por fim, foi testada a influência da vacinação na produção leiteira.

2 - Materiais e métodos

2.1 - Caracterização da exploração

Este estudo foi realizado entre o dia 9 de Dezembro e 17 de Maio de 2015 numa exploração leiteira com 780 vacas em ordenha, localizada no Concelho da Azambuja, Distrito de Lisboa. O sistema de produção é intensivo, com 3 ordenhas diárias. Todos os bovinos são da raça Holstein-Frísia.

A exploração é assistida por um veterinário a tempo inteiro.

No que diz respeito às instalações da exploração, os parques para as vacas em lactação e a sala de ordenha encontram-se separadas do parque das vacas secas, recria e maternidade a uma distância apreciável, o que evita o contacto próximo dos animais na fase de transição com as instalações das vacas em fase de produção leiteira. A área referida onde se encontram as vacas em lactação inclui:

- Parques separados para alojamento das vacas em ordenha, com camas de areia e um sistema de lavagem por onda de água;
- Parque para alojamento das vacas cujo leite não pode ser comercializado, por estarem em medicação cujo intervalo de segurança no leite ainda se encontre em vigor;
- Parque para alojamento de vacas em ordenha e em condições de saúde que justifiquem a separação do resto do efetivo. Tanto este parque como o anterior têm o pavimento coberto de cama de areia em toda a superfície, exceto na área dos comedouros. A limpeza é feita diariamente, com a mistura do material conspurcado e a areia, que são revolvidos com um trator;
- Sala de ordenha, num sistema de linha 2x20 em paralelo. A higiene na sala de ordenha é feita com um sistema de *desinfecção automática das tetinas* para utilizar entre a ordenha de uma vaca outra, utilização de máquinas de limpeza de tetos e pré-dipping, utilização de tintura de iodo para pós-dipping e limpeza e desinfecção da sala de ordenha diariamente com aspersores de detergente em espuma;
- Duas zonas anexadas à sala de ordenha, com manga de contenção para manio de vacas, selecionadas pelo sistema informático da exploração, e administração de tratamentos. Ambas são acedidas pelas vacas que saem da sala de ordenha através de portas automáticas, que abrem pela sinalização feita pelos *transponders* de identificação eletrónica, colocados na coleira das vacas em ordenha. Esta sinalização é pré-programada pelo sistema informático da vacaria controlado pelos funcionários responsáveis e permite que as vacas sejam conduzidas automaticamente para estas zonas de contenção ao invés de se dirigirem diretamente para os parques após a ordenha. Graças a este sistema é possível um manio mais fácil e rápido, com menos necessidade de mão-de-obra para separar as vacas à saída da ordenha, facilitando os processos de vacinação e também de

reagrupamento, inseminação, refúgio, exames clínicos, tratamentos específicos, entre outras ações de manejo;

Os parques das vacas em ordenha e a zona de espera para a ordenha têm aspersores de água acionados automaticamente com intervalos regulares para evitar que os animais sofram com *stress* térmico. As vacas secas são colocadas num parque com camas de areia semelhante aos parques para as vacas em ordenha, mas com sistema de limpeza com raspador por corrente. Já a maternidade é constituída por 2 parques separados, com cama de palha e, num dos casos, com manga de contenção para partos distócicos. As vacas são introduzidas nas maternidades 4 semanas antes da data prevista do parto e é feita uma vigilância regular dos partos por um funcionário responsável, sendo feitos registos do nível de dificuldade de cada parto.

As novilhas para inseminação são alojadas em 3 parques cobertos e separados, com cama de palha, onde permanecem até serem diagnosticadas como gestantes. São depois colocadas num parque exterior anexado a uma zona de pastoreio, onde as mesmas ficam instaladas até um mês antes do parto, quando são movidas para a maternidade.

A alimentação é feita por TMR, utilizando-se duas formulações diferentes, para as vacas secas e para as vacas em produção. A primeira é constituída por 44% de fibra neutro detergente (FND), 39,8% de FND na forragem e 33,2% de amidos, enquanto que a segunda utiliza 31% de FND, 20% de FND na forragem e 39,9% de amidos. A formulação para as vacas secas utiliza silagem de milho, farinha de colza, palha e levedura de cerveja. Para as vacas em produção é utilizada também a farinha de milho e outros componentes em menores quantidades como soja, polpa de citrinos e um pré-mix.

Nesta exploração, as novilhas são colocadas no parque de inseminação por volta dos 12 meses, com uma altura mínima estabelecida de 130 cm de altura do garrote. Se não apresentarem atividade éstrica até aos 13 meses é realizada uma avaliação do trato reprodutivo para despistar freemartinismo ou verificar a atividade ovárica. Se aos 14 meses não estiverem inseminadas, é aplicado um PRID durante 7 dias, com injeção de PGF_{2α} 24 horas antes de remover o mesmo. Segue-se a deteção de cio ou a IA a tempo fixo 48h após a remoção do PRID.

O manejo reprodutivo das vacas consiste em protocolos de sincronização e diagnóstico de gestação entre os 33 e 39 dias, 60 dias e antes da secagem da vaca. A sincronização reprodutiva é feita com uso dos protocolos Presynch-11, que têm início aos 39 ± 3 dias pós-parto, Ovsynch 56, Resynch (vacas inseminadas uma semana antes da data prevista para o 1º diagnóstico de gestação) e por deteção de estro, principalmente pelo recurso a dispositivos colocados na coleira das vacas em ordenha, os *tags*, que registam os picos de atividade da vaca e enviam a informação para a base de dados da exploração, mas também através da observação do comportamento característico do estro. O período de espera voluntário está definido para 45 dias.

A secagem das vacas múltíparas e primíparas é prevista para 37-43 dias e 51-57 dias antes da data prevista do parto, respetivamente. Estes intervalos nem sempre se verificam exatamente, já que, por motivos de facilidade de manejo, as vacas são secas apenas uma vez por semana. Os intervalos podem ser superiores se as vacas forem secas por motivos de baixa produção de leite.

Não foram introduzidos novos animais na exploração durante o período do estudo.

2.2 – Amostragem

Foram selecionadas para estudo 177 vacas leiteiras gestantes, de modo que aproximadamente metade da amostra fosse constituída por um grupo de nulíparas e a outra metade por um grupo de vacas,

todas elas com o parto previsto para o período compreendido entre Dezembro de 2015 e Abril de 2016. Deste modo, as múltíparas mais adiantadas teriam a secagem prevista para a primeira semana de Novembro de 2015, de modo a começar o protocolo experimental nessa altura. Todos os animais incluídos no estudo foram sujeitos ao mesmo protocolo de vacinação (*Hiprabovis-4*®, *Bravoxin 10*® e *Rotavec Corona*®) até entrarem no ensaio, com exceção da administração de *Bovilis BVD*®, a que as novilhas não foram sujeitas. No total, foram incluídas na amostra 100 vacas e 77 novilhas. Esta separação permite a existência de condições de amostragem para um estudo comparativo entre os resultados obtidos em vacas primíparas vs vacas múltíparas, já que as diferentes características de manejo antes da maternidade e relacionadas com o próprio indivíduo, para além da diferente influência que podem causar sobre os resultados do estudo, justificam uma análise separada. No entanto, não foi possível obter um grupo de vacas múltíparas com uma distribuição aproximada de diferente número de lactações devido ao facto do tamanho da amostra estar limitado ao que o tempo disponível para o estudo permitia. Os animais de cada grupo foram depois separados aleatoriamente noutros dois grupos, utilizando-se para essa amostragem o site *Randomizer*® (www.randomizer.org), de modo a obter números iguais entre primíparas e entre múltíparas. Foram criados, desta forma, os quatro grupos seguintes:

- Dois grupos de controlo (n=50 para o grupo de vacas múltíparas; n=38 para o grupo de novilhas nulíparas), com administração de vacina de controlo.
- Dois grupos de teste (n=50 para o grupo de vacas múltíparas; n=39 para o grupo de novilhas nulíparas), com administração de vacina de testagem.

2.3 – Vacinação

A colheita de material para o fabrico das vacinas de rebanho foi feita na mesma exploração, a 6 de Agosto de 2015, a partir de 4 vacas múltíparas nos primeiros dias do pós-parto, com diagnóstico de metrite. Para esta colheita recorreu-se a zaragatoas uterinas estéreis. A análise bacteriológica das amostras foi realizada no laboratório de bacteriologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. Após isolamento e identificação dos agentes causadores de metrite, a produção das vacinas a testar foi realizada pelo Laboratório Sorológico®. Foi produzida uma vacina de controlo que continha uma solução isotónica e tamponada sem qualquer conteúdo bacteriano e uma vacina de testagem que continha uma suspensão inativada de *E. coli* e *T. pyogenes* em solução isotónica e tamponada. Os restantes agentes relevantes na patogenia da metrite não foram incluídos na vacina de rebanho devido a indisponibilidade para a realização do estudo no tempo necessário para permitir a testagem da vacina com essa inclusão. As vacinas foram administradas pelo veterinário da exploração com conhecimento da listagem por grupos. O protocolo estipulado pelo fabricante determinava que as administrações deveriam ser dadas em duas doses de 3 e 5 ml por via intramuscular nas novilhas e vacas, respetivamente, com intervalo de 2 a 3 semanas entre vacinações. No entanto, devido a limitações relacionadas com o manejo da exploração, foi definida apenas uma dose de 5 ml para todos os animais incluídos no ensaio. O protocolo utilizado foi o mesmo entre os grupos de controlo e de teste. A administração da primeira dose vacinal foi feita aos 60 ± 15 dias antes da data prevista do parto para as vacas, e aos 30 ± 7 dias antes da data prevista do parto para as novilhas. A segunda dose vacinal foi administrada 26 ± 9 dias e 23 ± 5 dias após a primeira dose, para as vacas e novilhas respetivamente. Esta diferença entre os grupos com diferentes números de lactações deveu-se a limitações na rotina da exploração e nas condições de manejo para a administração das vacinas nas novilhas e vacas em fase de produção no mesmo intervalo de tempo antes do parto. Todos os animais que abortaram, pariram antes da administração de uma das doses vacinais, foram refugados ou morreram antes do parto, foram automaticamente removidos do estudo.

2.4 - Recolha de dados

Durante o período do pós-parto foram seguidos protocolos específicos para detetar e registar, não só a ocorrência de metrite, mas também de situações que pudessem predispor para esta doença, bem como o desenvolvimento de doenças do pós-parto que tivessem a metrite como fator predisponente.

2.4.1 – Metrite

Entre os 4 e 10 dias pós-parto, foi feita a medição da temperatura rectal em todos os animais. Aqueles em que foi obtida uma temperatura superior a 39,5° C foram tratados com ácido tolfenâmico e ceftiofur. Entre os 11 e 17 dias pós-parto, foi feita palpação rectal em todas as vacas para avaliação do estado de involução uterina e aspeto do corrimento vaginal, mesmo aquelas que demonstraram hipertermia anteriormente. O corrimento era extraído do trato genital por massagem vaginal à palpação rectal. Sempre que, no exame do útero, este fosse considerado como sobredimensionado na apreciação do seu volume e o corrimento vaginal tivesse com aspeto purulento e cheiro fétido a vaca era diagnosticada com metrite. Caso o corrimento fosse difícil de extrair por massagem vaginal, e os restantes sinais justificassem esta avaliação para confirmação do diagnóstico, era utilizado o método do Metrichcek®. As vacas a que foi feita a avaliação do estado de involução uterina e do corrimento vaginal após os 21 dias pós-parto, e a que foram detetados os mesmos sinais compatíveis com infeção uterina, foram diagnosticadas como tendo endometrite.

2.4.2 - Problemas relacionados com o parto – Dificuldade de parto, gemelaridade e retenção placentária (RP)

Todos os partos distócicos (dificuldade de parto com assistência humana) e gemelares foram registados na base de dados da exploração por funcionários responsáveis por essas tarefas na exploração. Todas as vacas foram observadas durante os primeiros dias do pós-parto para detetar sinais de retenção placentária (RP), nomeadamente, membranas fetais visíveis à saída do trato genital após 12 horas do parto ocorrido, temperatura rectal > 39,5°C, baixa produção leiteira, depressão e anorexia.

2.4.3 - Hipocalcémia clínica (HC)

Durante os primeiros dias do pós-parto, as vacas eram observadas para detetar sinais como decúbito com relutância em se levantar, temperatura rectal < 38,5°C ou > 39,5°C, taquicardia e ausência de reflexo pupilar, os quais indicariam para o diagnóstico de hipocalcémia clínica (HC).

2.4.4 – Cetose

Todas as vacas com queda na produção leiteira nos primeiros 30 dias pós-parto eram observadas para deteção de depressão, condição corporal baixa e atonia ruminal para o diagnóstico de cetose. Se considerado necessário era utilizado o teste *FreeStyle Precision™β Ketone* para medir os níveis sanguíneos de BHB e a análise da urina com o teste *Krulab V10®* para o diagnóstico de cetose, sendo assim considerado caso o resultado dos testes fosse [BHB]>1,2 mmol/L para o primeiro e positivo para o segundo.

2.4.5 - Deslocamento do abomaso à esquerda (DAE)

Todas as vacas que, além de apresentarem queda na produção leiteira nos primeiros 30 dias pós-parto, fossem observadas num estado de depressão, condição corporal baixa, atonia ruminal e fosse detetado um som metálico à auscultação com percussão do flanco esquerdo, era feito em relação às mesmas o diagnóstico de deslocamento do abomaso à esquerda (DAE).

2.5 - Registo dos dados

Todos os casos de metrite, RP, HC, cetose e DAE foram registados na base de dados da exploração para, juntamente com os casos de gemelaridade e partos distócicos, serem analisados estatisticamente neste estudo. Também foi verificado na base de dados da exploração o HDU de cada animal utilizado no ensaio. A produção leiteira total aos primeiros 30 dias de lactação, de cada vaca, também foi registada. As observações clínicas, diagnósticos e tratamentos acima mencionados foram feitos pelo veterinário da exploração.

2.6 - Análise estatística

O registo dos dados foi feito com o *software Microsoft Office Excel*® versão 2013. Para o tratamento dos dados e análise estatística foi utilizado o *software SPSS Statistics*® versão 22. Para que fosse possível uma análise coerente dos dados, estes foram agrupados em variáveis qualitativas dicotómicas para a vacinação (0 = controlo, 1 = vacina de rebanho), a paridade (0 = primíparas, 1 = múltíparas), cada doença do pós-parto relevante para o estudo, historial de doença uterina, gemelaridade e parto distócico (0 = ausente, 1 = presente), tendo em conta todos como possíveis fatores de risco para a metrite, exceto a cetose e o deslocamento de abomaso. Estas duas últimas foram consideradas como possíveis complicações da metrite no pós-parto. Foi também criada uma variável quantitativa para a produção total de leite aos primeiros 30 dias de lactação. Tendo em conta os diferentes fatores de risco associados à metrite, foi feita uma análise de regressão logística bivariada em relação à associação das variáveis de vacinação, paridade, ocorrência de parto distócico, gemelaridade, hipocalcémia clínica e existência de historial de doença uterina com o tratamento de metrite. Cada variável foi automaticamente analisada pelo método de regressão univariada em relação à sua associação com o tratamento de metrite, antes de ser incluído na análise de regressão bivariada. Foi definido como critério de inclusão dos diferentes fatores na análise de regressão bivariada, o nível de significância $p < 0,2$, e como critério de exclusão da análise, o nível de significância $p > 0,1$. Foi escolhido o método backward wald para comparação de modelos. Este método excluiu progressivamente cada variável que não respeite o pressuposto do nível de significância esperado para rejeitar a hipótese nula, na ordem do fator com menor associação para o fator com maior associação, até obter um modelo final apenas com os fatores com influência significativa no resultado da análise. Para este teste, foi considerada uma significância de $p < 0,05$ para aceitar as variáveis no modelo final. Foi ainda feita uma análise, pelo teste Qui-quadrado, da relação da vacinação com a ocorrência de cetose e deslocamento de abomaso à esquerda. Por fim, foi utilizado o teste Mann-Whitney para verificar diferenças na produção de leite aos primeiros 30 dias de lactação quando associada a vacinação com controlo ou vacina de rebanho e à ocorrência de metrite ou ausência desta. Para o teste Mann-Whitney considerou-se uma significância de $p < 0,05$.

3 – Resultados

3.1 - Animais excluídos do estudo

Dos 177 indivíduos incluídos no estudo, apenas 134 concluíram o ensaio vacinal. Das 50 vacas que representavam a amostra no grupo de controlo, 4 perderam a gestação antes da primeira dose vacinal de controlo e 1 depois da primeira e antes da segunda dose vacinal, pelo que foram todas excluídas do ensaio. No total permaneceram no estudo 95 vacas após o protocolo vacinal ter sido concluído. Isto deveu-se a um atraso no começo do protocolo, devido a dificuldade na execução das administrações durante períodos em que algumas funções prioritárias do veterinário da exploração tiveram de ser sobrepostas, com prejuízo da realização do ensaio. Das 38 novilhas selecionadas para o grupo de

controle, 24 foram excluídas do estudo. Destas, 1 morreu antes de entrar na maternidade, 1 teve um parto prematuro, não chegando a receber qualquer dose vacinal de controle, e 20 não completaram o protocolo vacinal devido à dificuldade, já antes referida, na conciliação com as restantes tarefas pelo veterinário da exploração, acrescida ainda do facto das novilhas só receberem a primeira administração quando entram na maternidade, 1 mês antes da data prevista do parto, o que encurta ainda mais a janela de vacinação. Das 39 novilhas que faziam parte do grupo de testagem, 14 foram excluídas do estudo. Enquanto que 1 teve um parto prematuro, as restantes não completaram o protocolo vacinal devido à dificuldade na conciliação com as restantes tarefas pelo veterinário da exploração.

3.2 - Análise de frequências e descritiva dos dados

Pela análise das frequências dos dados recolhidos neste estudo (Tabela 1), verificou-se que cerca de um terço das vacas que finalizaram todo o protocolo de ensaio eram primíparas (39 primíparas para 95 múltíparas). As percentagens de animais vacinados com vacina de rebanho e com controle foram próximas, com os valores respetivos de 56% e 44% (correspondente a 75 e 59 animais). Em relação aos casos de metrite, verificou-se uma percentagem de 10,4% de animais diagnosticados (14 vacas de 134). Relativamente aos fatores relacionados com o parto, verificou-se 8,2% de partos distócicos (11 casos) e apenas 2,2 % de casos de gemelaridade (3 casos). Em relação às doenças durante o pós-parto consideradas neste estudo, para além da metrite, observaram-se respetivamente 2,2% (3 casos), 0,7% (1 caso), 4,5% (6 casos) e 1,5% (2 casos) de ocorrência de RP, cetose, DAE e HC. Do total de animais incluídos, 12,7% (17 casos) tinham HDU.

Em média registou-se uma produção de 780,26 L de leite por cada vaca primípara ao fim de 30 dias de lactação, com um desvio padrão de 206,952 (Tabela 2). Para as vacas múltíparas foi registada uma média mais elevada de 1129,79 L de leite, com um desvio padrão de 253,337 (Tabela 3). Do total de vacas incumbidas neste estudo, 4 morreram antes dos 30 dias pós-parto, o que não permitiu obter a informação relativa ao parâmetro de produção em estudo para esses indivíduos.

		Frequência	Porcentagem
Paridade	Primípara	39	29,1%
	Múltipara	95	70,9%
Vacinação	Vacinada	75	56%
	Controlo	59	44%
Metrite	Com metrite	14	10,4%
	Sem metrite	120	89,6%
Dificuldade de parto	Parto distócico	11	8,2%
	Parto normal	123	91,8%
Gemelaridade	Parto gemelar	3	2,2%
	Parto não gemelar	131	97,8%
RP	Com RP	3	2,2%
	Sem RP	131	97,8%
HC	Com HC	2	1,5%
	Sem HC	132	98,5%
HDU	Com HDU	17	12,7%
	Sem HDU	117	87,3%
Cetose	Com cetose	1	0,7%
	Sem cetose	133	99,3%
DAE	Com DAE	6	4,5%
	Sem DAE	128	95,5%

Tabela 8 – Análise das frequências das duas classes representativas de cada variável considerada no estudo da vacinação, metrite, paridade e restantes fatores de risco para a ocorrência de metrite.

N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
38	10	1102	780,26	206,952

Tabela 9 - Análise descritiva do total de produção leiteira aos 30 dias pós-parto (Leite30) em vacas primíparas.

N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
92	24	1547	1129,79	253,337

Tabela 10 - Análise descritiva do total de produção leiteira aos 30 dias pós-parto (Leite30) em vacas múltiparas.

3.3 - Associação entre a metrite e respetivos fatores de risco predisponentes com a vacinação

Pela análise dos resultados da tabulação cruzada, verificou-se a influência da vacinação na metrite para as primíparas e múltiparas em separado (Tabela 4), principalmente para as múltiparas, com apenas 1 vaca doente das 50 que pertenciam ao grupo de testagem, e para 7 doentes no grupo de controlo. Já no caso das primíparas, verificaram-se 2 casos das 25 do grupo de testagem, e para 4 doentes no grupo de controlo. A mesma análise permitiu verificar a distribuição dos casos de doenças associadas ao risco de ocorrer metrite em relação aos grupos de controlo e testagem. Desta forma seria possível detetar fatores que pudessem influenciar o resultado relativo ao diagnóstico de metrite, alterando a relevância da análise relativa à eficácia da vacinação para evitar a ocorrência desta doença. Para os grupos de primíparas, não foram observadas diferenças relevantes na distribuição numérica de casos entre o grupo de controlo e o grupo de testagem, com exceção duma distribuição numérica semelhante para a ocorrência de partos distócicos, que se deve ao facto de terem sido registados muito poucos casos destas doenças para as vacas na primeira lactação. Para os grupos de múltiparas, embora também tenha havido um número muito pequeno de registos de doenças associadas ao risco de metrite, foi possível verificar uma diferença de 13 vacas com HDU no grupo de testagem para 4 no grupo de controlo.

		Primíparas		Múltiparas	
		Vacinada	Controlo	Vacinada	Controlo
Metrite	Com metrite	2	4	1	7
	Sem metrite	23	10	49	38
Dificuldade de parto	Parto distócico	2	2	2	5
	Parto normal	23	12	48	40
Gemelaridade	Parto gemelar	0	2	0	1
	Parto não gemelar	25	14	48	44
RP	Com RP	0	1	1	1
	Sem RP	25	13	49	44
HC	Com HC	0	0	0	2
	Sem HC	25	14	50	43
HDU	Com HDU	0	0	13	4
	Sem HDU	14	25	37	41

Tabela 11 – Tabulação cruzada dos resultados encontrados para a metrite e os fatores de risco considerados durante o estudo para o desenvolvimento desta com os resultados da vacinação, em vacas primíparas e múltiparas, separadamente.

3.4 - Associação entre os vários fatores de risco e ocorrência de metrite

Neste subcapítulo são apresentados os resultados do teste de regressão logística bivariada. Este teste permite averiguar a associação dos vários fatores suscetíveis de influenciar a ocorrência de metrite com o diagnóstico desta doença, após ter sido feita uma exclusão progressiva, em várias etapas, das variáveis sem um nível de significância aceitável ($p < 0,05$) para serem incluídas no modelo final, pelo método backward model.

O modelo final, que resultou da exclusão das variáveis que não cumpriam os requisitos de significância, está representado na Tabela 5. A vacinação foi a única variável não excluída no modelo final, com um nível de significância de $p = 0,012$, o que significa que representa o único fator que influenciou o resultado das ocorrências de metrite. O valor de *odds ratio* para esta variável ($\text{Exp}(B) = 0,182$ [I. C.: 0,048 – 0,686]) indica que o facto dos animais terem sido vacinados reduziu a probabilidade de ocorrer metrite em cerca de um quinto comparativamente à probabilidade de não ocorrer metrite. O coeficiente de regressão para a vacinação foi negativo, indicando uma associação negativa da administração da vacina de rebanho com o desenvolvimento de metrite após o parto. O valor deste coeficiente ($B = -1,705$), sendo próximo de -2, indica um risco quase duas vezes menor de ocorrer metrite após a vacinação.

	B	p	Exp(B)	95% I.C. para Exp(B)	
				Inferior	Superior
9ª Etapa Vacinação	-1,705	0,012	0,182	0,048	0,686

Tabela 12 – Resultados de modelo final do teste de regressão logística bivariada para a associação da metrite com a vacinação, paridade, dificuldade de parto, gemelaridade, retenção placentária, hipocalcemia clínica e historial de doença uterina, com o método backward wald.

3.5 - Associação da vacinação com cetose e deslocamento do abomaso à esquerda

Pelo teste Qui-quadrado, foi possível analisar se a vacinação teve alguma associação com a ocorrência de doenças que tivessem a metrite como fator de risco, o caso da cetose e do deslocamento do abomaso à esquerda. Como pode ser observado na Tabela 7, ambas as afeções foram detetadas em pequeno número nas múltiparas e não foram diagnosticadas em nenhuma primípara, impossibilitando qualquer análise neste sentido para estas vacas. No caso das múltiparas, nenhuma das variáveis demonstrou ter uma associação estatisticamente significativa com a vacinação para uma probabilidade de significância de $p < 0,05$.

		Vacinada		Controlo		p (multíparas)
		Primíparas	Multíparas	Primíparas	Multíparas	
Cetose	Com cetose	0	0	0	1	0,289
	Sem cetose	14	50	25	44	
DAE	Com DAE	0	2	0	4	0,328
	Sem DAE	14	48	25	41	

Tabela 13 – Resultados do teste Qui-quadrado para a associação da variável “vacinação” com as variáveis “cetose” e “deslocamento do abomaso”. Análise estatística para as vacas primíparas não foi possível por ausência de casos com cetose ou deslocamento de abomaso à esquerda. DAE – Deslocamento de abomaso à esquerda.

3.6 - Associação da produção leiteira total aos 30 dias pós-parto (Leite30) com vacinação e com metrite

Foram comparadas as médias de produção leiteira total aos 30 dias pós-parto (Leite30) entre as vacas que contraíram metrite e as que não tiveram a doença, bem como entre as vacas que foram vacinadas com a vacina de rebanho e as que foram vacinadas com o controlo. Os resultados são apresentados nas Tabelas 7 e 8. Verificaram-se médias de Leite30 superiores para as vacas que não contraíram metrite comparativamente às que tiveram a doença, tanto nas primíparas ($791,78 \pm 194,973$ L para $718,83 \pm 275,44$ L) como nas múltiparas ($1144,56 \pm 251,311$ L para $974,75 \pm 235,337$ L). A média de Leite30 para as primíparas às quais foi administrada a vacina de rebanho para a metrite ($767,42 \pm 208,323$ L) foi inferior à que se verificou para aquelas a que foi administrado o controlo ($802,29 \pm 210,45$ L), embora os valores tenham sido muito próximos. Essa proximidade foi ainda maior para as médias de Leite30 encontradas para as múltiparas injetadas com a vacina de rebanho ($1131,58 \pm 295,897$ L) e para as que foram injetadas com o controlo ($1127,84 \pm 200,285$ L).

		Média de Leite30 (litros)	N	Desvio Padrão
Metrite	Sem metrite	791,78	32	194,973
	Com metrite	718,83	6	275,440
Vacinação	Vacina	767,42	24	208,323
	Controlo	802,29	14	210,450

Tabela 14 – Médias de produção leiteira total aos 30 dias pós-parto (Leite30) nas primíparas relativamente às variáveis “metrite” e “vacinação”.

		Média de Leite30 (litros)	N	Desvio Padrão
Metrite	Sem metrite	1144,56	84	251,311
	Com metrite	974,75	8	235,337
Vacinação	Vacina	1131,58	48	295,897
	Controlo	1127,84	44	200,285

Tabela 15 – Médias de produção leiteira total aos 30 dias pós-parto (Leite30) nas múltiparas relativamente às variáveis “metrite” e “vacinação”.

Através do teste de Mann-Whitney, verificou-se que a associação de Leite30 com o fator da vacinação não apresentou um nível de significância que correspondesse ao pressuposto de $p < 0,05$ para definir uma relação estatística, tanto para as primíparas como para as múltiparas.

O mesmo teste foi ainda utilizado para averiguar se existia uma associação de Leite30 com a ocorrência de metrite. O valor mais elevado do *rank* médio nesta variável em relação a Leite30 correspondeu à classe “sem metrite”, nas vacas múltiparas (Tabela 9), o que significa que, em geral, estas vacas tiveram uma Leite30 maior quando não contraíram metrite. Tal como está representado na Tabela 10, Leite30 foi significativamente maior nas múltiparas sem metrite que nas múltiparas com a doença ($p = 0,026$), considerando um nível de significância de $p < 0,05$. A mesma associação não foi encontrada para as vacas primíparas.

	Leite30
Significância do teste bilateral	0,026

Tabela 16 – Resultado do teste Mann-Whitney para a associação da produção leiteira aos 30 dias pós-parto (Leite30) em litros com a metrite nas vacas múltiparas, com os valores de *rank* médio das duas classes da variável “metrite”.

	N	<i>Rank</i> médio
Sem metrite	84	48,42
Com metrite	8	26,38

Tabela 17 - Resultado do teste Mann-Whitney para associação da produção leiteira aos 30 dias pós-parto (Leite30) em litros com a metrite nas vacas múltiparas, com o valor de significância determinado.

4 – Discussão

4.1 - Vacinação e metrite

A incidência de metrite observada neste estudo foi de 10,4% para o total das vacas que acabaram todo o protocolo do ensaio clínico. Este valor está muito próximo dos valores citados por LeBlanc et al. (2011) e Galvão et al., (2011b), que foram de 10% e 8%, respetivamente. Ambos estes trabalhos, permitem definir um valor *cut-off* para a incidência de metrite em explorações leiteiras de 8-10%, no qual a incidência da doença no presente estudo se encontra praticamente englobada.

Houve uma distribuição razoavelmente equilibrada de indivíduos aos quais foi administrado o controlo (44%) e a vacina de rebanho (56%). Apesar dos animais dos grupos das novilhas e das vacas terem sido igualmente distribuídos por grupos de testagem e controlo, de modo a igualar o mais possível as proporções de animais vacinados e não vacinados, estas percentagens acabaram por se desnivelar um pouco devido à exclusão de alguns dos indivíduos do ensaio experimental.

O facto de apenas 2% (1 vaca em 50) das múltiparas do grupo de testagem contraírem metrite e, de todas aquelas que desenvolveram esta doença, apenas 12,5% (1 vaca em 7) serem do grupo de testagem, demonstra uma clara melhoria dos resultados em relação ao grupo de controlo. Para as primíparas, os resultados não foram tão consistentes, verificando-se 8% (2 vacas em 23) das vacas vacinadas a contraírem metrite e um terço das vacas afetadas inseridas no grupo de testagem, mas com um número muito inferior de animais na amostra relativamente às múltiparas. De facto, está explicado que há um maior risco de metrite em primíparas essencialmente devido a uma maior tendência de sofrerem alguns problemas relacionados com o parto, que predispõem para a ocorrência da doença no pós-parto, tal como a distócia (Markusfeld, 1987). Esse risco acrescido poderá ter aumentado a incidência de metrite nas vacas primíparas incluídas no presente estudo. No entanto, pela observação dos registos dos casos de distócia, verifica-se que as primíparas do grupo de testagem tiveram a mesma incidência deste problema que as primíparas do grupo de controlo. Poderão ser necessários registos mais precisos relativamente aos partos, já que poderão ter ocorrido casos de distócia não registados quando as vacas conseguiram parir sem assistência, ou poderão ter havido casos de nados-mortos, não contemplados pelos dados deste estudo, que são igualmente fatores de risco para a metrite (Markusfeld, 1987).

Os resultados relativos à incidência de metrite para as primíparas neste estudo foram um pouco menos satisfatórios que aqueles encontrados por Machado et al. (2014) que registou uma incidência de 2% para a metrite em primíparas, às quais havia sido administrada uma vacina inativada, com os principais agentes envolvidos na patogenia da doença. No entanto, há que referir algumas diferenças entre o presente estudo e o estudo feito por este autor. Em primeiro lugar, os agentes utilizados envolveram o *F. necrophorum*, que não foi incluído na vacina utilizada no presente estudo, e além disso, o diagnóstico foi feito com palpação retal aos 6 ± 1 dias pós-parto e não dos 11 aos 17 dias pós-parto, como no presente trabalho. Com o estabelecimento de um meio anaeróbio no útero durante as infeções uterinas, alguns agentes anaeróbios proliferam e contribuem para a patogenicidade destas doenças (Ruder et al., 1981; Bicalho et al., 2012). Na verdade, *F. necrophorum* e *P. melaninogenica* produzem, respetivamente, uma leucotoxina e uma substância que inibe a fagocitose (Ruder et al., 1981; Sheldon et al., 2009). A inclusão de um ou de ambos estes agentes na vacina de rebanho utilizada neste estudo poderia ter contribuído para uma menor incidência de metrite para as primíparas e talvez também para as múltiparas. Segundo Dolezal (2008), o diagnóstico de metrite por palpação retal antes dos 15 dias pós-parto pode perder alguma validade já que ainda é uma fase precoce para se distinguir um estado fisiológico de involução uterina e um estado patológico. Por esta perspetiva, o presente

estudo apresenta resultados mais fiáveis relativamente à incidência de metrite que o de Machado et al. (2014), já que terá utilizado um método de diagnóstico mais específico. No entanto, o peso da utilização da vacina de rebanho com *F. necrophorum* incluído na formulação poderá ter sido maior que o método utilizado para o diagnóstico de metrite na obtenção dos resultados encontrados no estudo deste autor em relação à incidência da doença.

4.2 - Fatores de risco para a metrite

Devido a estas exclusões ao longo do ensaio, o número de primíparas diminuiu muito em termos absolutos e em relação ao número de múltíparas, neste caso para menos de metade. Isto causou algumas limitações na realização de uma análise comparativa dos resultados deste estudo para estes dois grupos.

Para além da paridade, contemplou-se outros fatores de risco para a ocorrência de metrite neste estudo. Os partos distócicos podem levar à morte dos fetos, causando metrite desta forma, além de serem muitas vezes a causa de lesões no tecido uterino. Os partos que decorrem de gestações gemelares têm um maior risco de serem distócicos do que os partos que envolvem o nascimento de um só feto, além de estarem normalmente associados a um atraso na involução uterina (Markusfeld, 1987; Gregory et al., 1990). Bicalho et al. (2010) comprovaram a associação das gestações gemelares com uma maior contaminação do útero com *E. coli*. A retenção placentária também é um fator de risco importante a considerar para a ocorrência de metrite devido ao atraso na expulsão do conteúdo necrótico presente no útero no pós-parto, que potencia o crescimento bacteriano (Markusfeld, 1987; Sheldon et al., 2009). Martinez et al (2012) referiram que a hipocalcémia poderá causar alguma imunossupressão pela diminuição da atividade dos neutrófilos (Martinez et al., 2012). Esta doença também está relacionada com diminuição da frequência das contrações do miométrio e consequente atraso na expulsão da lóquia (Kamgarpour et al., 1999; Földi et al., 2006). Também foi considerado o historial de infeções uterinas de cada animal como um possível fator de risco para a metrite. Num estudo de Hossein-Zadeh & Ardalan (2011), a incidência prévia de casos de mastites clínicas foi um fator que predispôs os mesmos animais à reinfeção das glândulas mamárias, com um valor de *odds ratio* que demonstrava o quádruplo da probabilidade de ocorrer mastite clínica comparativamente à probabilidade dos animais se manterem saudáveis ($\text{Exp}(B) = 4,15$ [I. C.: 3,26 – 5,08]). Não foram encontrados estudos pelo autor que demonstrassem a mesma relação de infeções prévias no útero com a posterior incidência de metrites. No entanto, de forma semelhante ao que foi verificado por Hossein-Zadeh & Ardalan (2011), poderia haver uma predisposição individual para reinfeções em vacas que já padeceram previamente de metrite após o parto.

A falta de condições apropriadas de higiene durante o parto é outra causa importante na etiologia multifatorial da metrite (Lewis, 1997). Este fator foi controlado pela desinfecção da zona vulvar e utilização de luvas descartáveis pelos funcionários da exploração durante os partos assistidos e pela utilização da palha como material das camas das maternidades. Segundo Machado e Bicalho (2015), esta representa um dos materiais que oferece melhores padrões higiénicos para a maternidade relativamente aos materiais mais frequentemente utilizados. No entanto, alguns fatores nutricionais importantes não foram controlados no presente estudo porque o manejo nutricional dos animais incluídos no ensaio experimental era aquele praticado por norma na exploração. A ausência de suplementação com antioxidantes, como o Selénio e a vitamina E, durante o período de secagem poderá ter aumentado a predisposição para infeções uterinas (Földi et al, 2006; Spears & Weiss, 2008; Bicalho et al., 2014).

Foram observadas incidências muito baixas de gemelaridade (2,2%), RP (2,2%) e HC (1,5%) no período pós parto, na população considerada após o ensaio experimental. Isto não possibilitou o aproveitamento destes registos para a execução de uma análise consistente.

Os resultados da vacinação na ocorrência de metrite poderão ser influenciados pela presença destes fatores de risco. A maior incidência de casos de partos distócicos, partos gemelares, RP, HC ou maior quantidade de indivíduos com HDU nos grupos de controlo poderá aumentar a incidência de metrite nestes animais e contribuir para uma maior diferença na mesma entre os grupos de testagem e de controlo. A tabulação cruzada dos vários fatores de risco com a vacinação em primíparas e múltiparas demonstra ausência de casos de quaisquer registos de HC ou HDU para as primíparas, não existindo influência alguma destes fatores nos resultados da vacinação para a metrite nestes animais. Já a gemelaridade e RP em ambas as primíparas e múltiparas e a HC nas múltiparas não podem ser consistentemente analisadas nesse sentido já que os casos registados foram muito poucos. Nas primíparas foram registados os mesmos números de partos distócicos em primíparas para o grupo de controlo e de testagem (1 caso em ambos os grupos), sugerindo a ausência de qualquer influência da variável “dificuldade de partos” no resultado da vacinação para a metrite. Nas múltiparas, houve um maior número de partos distócicos no grupo de controlo (5 casos para 2 no grupo de controlo), o que indica uma possível influência deste fator no resultado da vacinação para a metrite. Para as mesmas vacas, registaram-se mais casos com HDU no grupo de testagem (13 casos para 4 no grupo de controlo). Esta última observação parece demonstrar a ausência de qualquer influência do HDU no resultado da vacinação para a metrite.

4.3 - Fatores com influência na incidência de metrite segundo o modelo de regressão logística bivariada

O teste de regressão logística bivariada contemplou a vacinação e paridade, juntamente com todos os fatores de riscos acima referidos para analisar quais destas variáveis poderiam ter uma associação estatisticamente significativa com a metrite. Desta forma foi possível averiguar, segundo este método, se a vacinação teve influência na ocorrência de casos de metrite, e se os fatores de risco considerados, incluindo a paridade, tiveram alguma influência nesse acontecimento.

Os resultados do teste de regressão logística indicaram que apenas a vacinação foi estatisticamente significativa para o aparecimento de casos de metrite. De facto, a vacinação reduziu a probabilidade de ocorrer metrite em cerca de um quinto, comparativamente à probabilidade de não ocorrer metrite, para todos os animais que finalizaram o ensaio experimental. Nenhum dos restantes fatores foi considerado relevante por este método estatístico, talvez devido à distribuição que se verificou dos casos e/ou ao reduzido número de casos registados, que não permitiu uma análise estatística em relação a estes fatores. A paridade pode ter sido rejeitada do modelo final devido à desigualdade de números entre primíparas e múltiparas ou pela distribuição dos casos, já que, na verdade, verificaram-se menos casos de animais dos grupos de controlo que no grupo de testagem, para as primíparas.

Os resultados do teste de regressão logística bivariada sugerem que a vacinação, por si só e sem a influência dos restantes fatores de risco considerados, permitiu a redução dos casos de metrite em todo o efetivo testado.

4.4 - Vacinação e doenças associadas à metrite - cetose e deslocamento de abomaso à esquerda (DAE)

A incidência de cetose foi muito baixa em toda a população em estudo, verificando-se apenas 1 caso de uma múltipara. Já o DAE teve uma incidência de 4,5%, com 6 casos diagnosticados, também todos eles em múltiparas. Estes resultados encontram-se muito próximos do limite de 3%, estabelecido por Mulligan, O'Grady, Rice & Doherty (2006), para a incidência de DAE em vacas leiteiras. A maior incidência desta doença em múltiparas está de acordo com a literatura, embora estudos mais recentes apontem para uma ocorrência igualmente comum da doença em vacas primíparas, ou mesmo mais expressiva na primeira lactação (Sexton, Buckley & Ryan, 2007; Fubini & Divers, 2008).

Devido ao diagnóstico tardio dos casos de cetose no pós-parto esta doença foi considerada como uma possível complicação da metrite, e não como um fator de risco. Embora seja difícil estabelecer uma relação causa efeito entre metrite e cetose, a primeira é uma doença que se começa a desenvolver a partir da altura do parto (Dohoo & Martin, 1984). Daí que é mais provável que seja um fator de risco para a cetose no pós-parto em vez de se verificar a situação contrária (Garros et al., 2013). A menor ingestão devido à perda de apetite ou incapacidade de se levantar e comer predispõem vacas com infeção uterina a cetose e a deslocamento do abomaso à esquerda (Gröhn et al., 1989; Shaver, 1997).

Estas duas doenças, estando associadas à metrite, deveriam ocorrer com menos frequência nas vacas que foram injetadas com a vacina de rebanho, tendo em conta que a diminuição da incidência de metrite contribuiria igualmente para a redução da incidência destas doenças. Mais uma vez não foi possível a análise destes fatores para as primíparas devido a falta de registos destas doenças, associado provavelmente à pequena amostra de indivíduos nos grupos de vacas de primeiro parto. Embora o número de casos seja muito reduzido para uma análise, a vacinação parece ter reduzido o número de casos de cetose e DAE nas múltiparas. No entanto, estes resultados não são estatisticamente significativos, possivelmente devido ao escasso número de casos presentes, tornando-se impossível retirar qualquer conclusão no sentido da eficácia da vacinação para estas doenças. A comparação com os valores de incidência destas doenças na exploração registados em anos anteriores poderiam ser úteis para determinar se poderá ter havido alguma diminuição na sua frequência que pudesse ser associada a uma diminuição na incidência de metrite.

4.5 – Produção leiteira aos 30 dias pós-parto (Leite30)

O pico de produção é o parâmetro que se utiliza tradicionalmente para avaliar a capacidade produtiva das vacas leiteiras na fase inicial da lactação. Representa o máximo volume de leite produzido num dia pela vaca, que normalmente é observado dentro dos 75 dias de lactação (Nordlund & Cook, 2004). Esta medida não foi quantificada para os animais do presente estudo devido a indisponibilidade para a recolha desses dados no período de tempo necessário para esse efeito. Por essa razão foi utilizada a produção leiteira total de cada vaca nos primeiros 30 dias pós-parto (Leite30) para avaliar a eficácia produtiva das vacas incluídas no estudo.

Em média registou-se uma produção de 780,26 L de leite por vaca ao fim de 30 dias de lactação para as vacas primíparas e de 1129,29 L para as vacas múltiparas. Estes registos encontram-se em sintonia com o que está descrito na literatura relativamente ao esperado em termos de produção para vacas com um ou mais partos, que se traduz numa maior capacidade produtiva nas vacas múltiparas comparativamente às primíparas, geralmente (Wathes et al., 2007). Nordlund & Cook (2004) referiu a produção leiteira diária de 22 L para primíparas e de 31 L (valores convertidos em litros pelo site www.ifcndairy.org) para múltiparas como valores mínimos em vacas cuja produção não esteja a ser influenciada por problemas de saúde. As médias de produção encontradas no presente estudo

permitem estimar uma produção diária de aproximadamente 26 L para as primeiras e 38 L para as segundas, valores que se encontram acima dos limites mínimos referidos por Nordlund & Cook (2004). Bell & Roberts (2007) estabeleceram a associação da metrite com menor produção leiteira. Segundo Giuliodori et al. (2013), a redução da IMS nas vacas afetadas com metrite são a potencial causa para a redução da produção, já que acaba por ocorrer uma diminuição de substrato energético disponível para a síntese de leite. De facto, as médias de Leite30 para as vacas que contraíram metrite foi menor que naquelas que não padeceram desta doença e isto verificou-se tanto para as primíparas como para as múltiparas. Os valores médios de Leite30 encontrados para os dois grupos de diferentes paridades utilizados neste estudo estiveram muito próximos da média dos valores de produção leiteira mensal registados para todas as primíparas e múltiparas pertencentes ao efetivo da mesma exploração entre o mês de Janeiro e Maio de 2016, que foram 798 L e 1137 L, respetivamente. As médias de Leite30 em ambos os grupos de diferentes classes de paridade foram mais próximas destas médias do efetivo total nas vacas sem metrite que nas vacas com esta infeção, o que está de acordo com o estabelecido por Bell & Roberts (2007). No entanto, há que notar que estas médias foram calculadas de um total de 112 primíparas e 210 múltiparas, uma proporção próxima, mas ligeiramente diferente da observada no presente estudo. A comparação previamente mencionada com a produção leiteira do efetivo total da exploração, referente ao período em que este foi realizado, embora útil para criar uma noção da produtividade dos animais no grupo comparativamente ao efetivo total, não é suficiente para estabelecer uma associação consistente do fator da doença com uma eventual diminuição na produção leiteira, sendo para isso necessária uma comparação com a produção num período anterior ao estudo (Fourichon et al., 1999).

Determinou-se que a Leite30 foi significativamente maior para as vacas que não tiveram metrite que nas vacas que desenvolveram a doença. No entanto, isto só aconteceu na análise da produção das vacas múltiparas. Estes resultados estão de acordo com aqueles que foram encontrados por Wittrock et al. (2009). Estes autores encontraram um maior risco de refugo devido à metrite para as vacas múltiparas, justificado por menor produção leiteira e por um estado de saúde mais débil. No mesmo estudo, as vacas primíparas com metrite não diferiram das primíparas saudáveis na IMS, nem na produção leiteira. De facto, há indícios de que a resposta imunitária nas múltiparas tende a ser menor e mais lenta que nas primíparas (Lessard et al., 2004). No entanto, há que referir que as múltiparas tendem a produzir menos leite nas primeiras semanas de lactação (Wittrock et al., 2009). Há ainda que notar que existem diversos fatores de risco para a diminuição de produção leiteira que podem influenciar os resultados obtido.

Pelo princípio de que a vacinação previne a metrite, foi feita também uma análise para procurar uma associação significativa entre a produção leiteira aos 30 dias pós-parto e a vacinação. Esta não foi encontrada em nenhum dos grupos de diferentes níveis de paridade. Mesmo que tenha sido encontrada uma associação negativa entre a produção leiteira e a metrite para as múltiparas, poderá ser necessária uma relação mais consistente entre vacinação e ausência de metrite para que a primeira possa ter uma associação significativa com uma maior produção leiteira.

Não foi testado o impacto da vacinação na eficiência reprodutiva das vacas devido à falta de tempo necessário para serem obtidos os índices reprodutivos que permitem uma avaliação da mesma. Futuramente, estes índices poderão ser obtidos das vacas incluídas neste estudo de modo a serem avaliados.

5 – Conclusão

A utilização de uma vacina de rebanho em vacas de leite, administrada antes do parto, reduziu a probabilidade de ocorrer metrite em cerca de um quinto comparativamente à probabilidade de não

ocorrer metrite. A mesma vacina levou a uma redução significativa da incidência da doença comparativamente à utilização de um controlo, tendo-se detetado 1 caso da doença nos animais vacinados face a 7 nos animais que receberam o controlo. No entanto este resultado só se verificou para as vacas múltiparas, não havendo uma melhoria significativa no estado de saúde uterina após o parto nas primíparas a que foi administrada a vacina comparativamente às que foi administrado o controlo. Estes resultados apontam para uma vantagem na utilização desta vacina de rebanho para prevenir a metrite em vacarias de leite, mas apenas em vacas múltiparas. Seria também interessante a nível prático e económico para as explorações, estudar a eficácia desta vacina de rebanho quando aplicada numa só dose. O presente estudo foi realizado apenas ao nível de uma exploração leiteira, por isso há que considerar sempre as diferentes características de cada exploração que poderão influenciar a eficácia da vacina, tanto a nível da genética dos animais, prevalência de outras doenças na exploração, condições de alojamento, nutrição e outros aspetos no manejo dos animais, particularmente os que estão relacionados com o pós-parto.

A mesma vacina de rebanho não demonstrou qualquer influência significativa na ocorrência de doenças cuja etiopatogenia está associada à metrite como fator de risco, como a cetose e o deslocamento do abomaso à esquerda. O autor sugere que, em futuros estudos que abordem esta questão, seja utilizada uma amostra de maior dimensão, de modo a obter um maior número de casos relevantes e conseguir uma análise mais consistente.

Mesmo não tendo havido uma melhoria na produção leiteira associada à vacinação para a metrite, verificou-se uma relação entre a ocorrência de metrite e a produção total ao fim dos primeiros 30 dias de lactação nas vacas múltiparas. Isto permite concluir que embora a vacinação não permita necessariamente uma melhoria na produção leiteira, poderá eventualmente prevenir perdas na mesma pela redução da incidência de metrite na exploração, quando administrada nas vacas múltiparas. Além disso, o parâmetro mais comum utilizado para avaliar a produção leiteira, o pico de produção, não foi verificado neste estudo. A investigação da associação desta vacina com a produção leiteira pode ser melhorada pela utilização de amostras de primíparas e múltiparas de maiores dimensões, utilização do pico de produção como parâmetro de avaliação, comparação com os picos de produção verificados anteriormente ao estudo e consideração dos outros fatores de risco, para além da metrite, que podem afetar a produção leiteira.

Para além de poder evitar perdas relacionadas com produção leiteira, e com gastos em tratamentos convencionais, resta saber se a vacinação tem o potencial de melhorar a eficiência reprodutiva na exploração, já que a metrite está associada ao aumento dos dias em aberto e da taxa de refugo reprodutivo. No futuro, seria do interesse de várias partes descobrir se esta vacina de rebanho oferece esta vantagem e se tem a capacidade de causar um impacto económico positivo nas explorações leiteiras.

Bibliografia

- Abuelo, A., Hernandez, J., Benedito, J. L. & Castillo, C. (2014). The importance of the oxidative status of dairy cattle in the periparturient period: revisiting antioxidant supplementation. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 99(6), 1003-1016.
- Ambrose, D. J. (2015). Postpartum Anestrus and its Management in Dairy Cattle. In R. M. Hopper (Ed.), *Bovine Reproduction* (456–470). Ames, Iowa, EUA: John Wiley & Sons, Inc.
- Andrade, S. C. N. (2013). *Desempenho produtivo e reprodutivo de vacas Holstein-Frísia em comparação com os respectivos cruzamentos com Vermelha Sueca e Montbéliarde*. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia/UL.
- Austin, E. J., Mihm, M., Ryan, M. P., Williams, D. H. & Roche, J. F. (1999). Effect of duration of dominance of the ovulatory follicle on onset of estrus and fertility in heifers. *Journal of Animal Science*, 77(8), 2219-2226.
- Azawi, O. I. (2008). Postpartum uterine infection in cattle. *Animal Reproduction Science*, 105(3-4), 187-208.
- Baird, G. D. (1982). Primary ketosis in the high-producing dairy cow: Clinical and subclinical disorders, treatment, prevention, and Outlook. *Journal of Dairy Science*, 65(1), 1-10.
- Banos, G., Wall, E., Coffey, M. P., Bagnall, A., Gillespie, S., Russell, G. C. & McNeilly, T. N. (2013). Identification of immune traits correlated with dairy cow health, reproduction and productivity. *Plos One*, 8(6), e65766 [Online]. Acedido a 12 de Junho de 2016 em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3680463/pdf/pone.0065766.pdf>.
- Barr, H. L. (1975). Influence of Estrus Detection on Days Open in Dairy Herds. *Journal of Dairy Science*, 58(2), 246-247.
- Bartolome, J. A., Khalloub P., de la Sota, R. L., Drillich M. & Melendez, P. G. (2014). Strategies for the treatment of dairy cows at high risk for postpartum metritis and for the treatment of clinical endometritis in Argentina. *Tropical Animal Health and Production*, 46(1), 79-85.
- Battaglia, D. F., Krasa, H. B., Padmanabhan, V., Viguié, C. & Karsch, F. J. (2000). Endocrine alterations that underlie endotoxin-induced disruption of the follicular phase in ewes. *Biology of Reproduction*, 62(1), 45-53.
- Beam, S. W. & Butler, W. R. (1997). Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biology of Reproduction*, 56(1), 133-142.
- Bell, A. W. (1995). Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science*, 73(9), 2804-2819.
- Bell, M. J. & Roberts, D. J. (2007). The impact of uterine infection on a dairy cow's performance. *Theriogenology*, 68(7), 1074-1079.
- Benzaquen, M. E., Risco, C. A., Archbald, L. F., Melendez, P., Thatcher, M.-J. & Thatcher, W. W. (2007). Rectal temperature, calving-related factors, and the incidence of puerperal metritis in postpartum dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90(6), 2804-2814.

- Berry, D. P., Buckley, F., Dillon, P., Evans, R. D., Rath, M. & Veerkamp, R. F. (2003). Genetic relationships among body condition score, body weight, milk yield, and fertility in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 86(6), 2193-2204.
- Bicalho, R. C., Machado, V. S., Bicalho, M. L. S., Gilbert, R. O., Teixeira, A. G. V., Caixeta, L. S. & Pereira, R. V. V. (2010). Molecular and epidemiological characterization of bovine intrauterine *Escherichia coli*. *Journal of Dairy Science*, 93(12), 5818-5830.
- Bicalho, M. L. S., Machado, V. S., Oikonomou, G., Gilbert, R. O., Bicalho, R. C. (2012). Association between virulence factors of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, and *Arcanobacterium pyogenes* and uterine diseases of dairy cows. *Veterinary Microbiology*, 157(1-2), 125-131.
- Bicalho, M. L. S., Lima, F. S., Ganda, E. K., Foditsch, C., Meira Jr., E. B. S., Machado, V. S., Teixeira, A. G. V., Oikonomou, G., Gilbert, R. O. & Bicalho, R. C. (2014). Effect of trace mineral supplementation on selected minerals, energy metabolites, oxidative stress, and immune parameters and its association with uterine diseases in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 97(7), 4281-4295.
- Bisinotto, R. S., Greco, L. F., Ribeiro E. S., Martinez N., Lima, F.S., Staples, C.R., Thatcher, W. W., Santos, J.E.P. (2012). Influences of nutrition and metabolism on fertility of dairy cows. *Animal Reproduction*, 9(3), 260-272.
- Bosu, W. T. K., Peter, A. T. & DeDecker, R. J. (1988). Short-term changes in serum luteinizing hormone, ovarian response and reproductive performance following gonadotrophin releasing hormone treatment in postpartum dairy cows with retained placenta. *Canadian Journal of veterinary Research*, 52(2), 165-171.
- Bondurant, R. H. (1999). Inflammation in the bovine female reproductive tract. *Journal of Animal Science*, 77(2), 101-110.
- Bonnett, B. N., Martin, S. W., Gannon, V. P. J., Miller, R. B. & Etherington, W. G. (1991). Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows III. Bacteriological analysis and correlations with histological findings. *Canadian Journal of veterinary Research*, 55(2), 168-173.
- Bonnett, B. N., Martin, S. W. & Meek, A. H. (1993). Associations of clinical findings, bacteriological and histological results of endometrial biopsy with reproductive performance of postpartum dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, 15(2-3), 205-220.
- Bova, T. L., Chiavaccini, L., Cline, G. F., Hart, C. G., Matheny, K., Muth, M. A., Voelz, B. E., Kesler, D. & E. Memili (2014). Environmental stressors influencing hormones and systems physiology in cattle. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12, 58 [Online]. Acedido a 19 de Maio de 2016 em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4094414/pdf/1477-7827-12-58.pdf>.
- Brett, J. A. & Meiring, R. W. (2015). Evaluating reproductive performance on dairy farms. In R. M. Hopper (Ed.), *Bovine Reproduction* (370-373). Ames, Iowa, EUA: John Wiley & Sons, Inc.
- Bretzlaff, K. (1987). Rationale for treatment of endometritis in the dairy cow. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 3(3), 593-607.
- Bruun, J., Ersbøll, A.K. & Alban, L. (2002). Risk factors for metritis in Danish dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, 54(2), 179-190.

- Burfeind, O., Bruins, M., Bos, A., Sannmann, I., Voigtsberger, R. & Heuwieser, W. (2014). Diagnosis of acute puerperal metritis by electronic nose device analysis of vaginal discharge in dairy cows. *Theriogenology*, 82(1), 64-70.
- Carvalho, R. F. S. M. (2007). *Enquadramento regulamentar das vacinas autógenas de uso veterinário e caracterização da sua utilização em Portugal*, dissertação de mestrado. Lisboa: Faculdade de Farmácia, UL.
- Cebra, C. K., Heidel, J. R., Crisman, R. O. & Stang, B. V. (2003). The relationship between endogenous cortisol, blood micronutrients, and neutrophil function in postparturient Holstein cows. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17(6), 902-907.
- Chen, Y. & Junger, W. G. (2012). Measurement of oxidative burst in neutrophils. *Methods of Molecular Biology* 844, 115-124.
- Clark, T. G., Cassidy-Hanley, D. (2005). Recombinant subunit vaccines: Potentials and constraints. *Developments in Biologicals*, 121, 153-163.
- Cohen, M. S. (1994). Molecular events in the activation of human neutrophils for microbial killing. *Clinical Infectious Diseases*, 18(2), 170-179.
- Cooper, D. A., Carver, D. A., Villeneuve, P., Silvia, W. J. & Inskeep, E. K. (1991). Effects of progestagen treatment on concentrations of prostaglandins and oxytocin in plasma from the posterior vena cava of post-partum beef cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, 91(2), 411-421.
- Corbeil, L. B. (1999). Immunization and diagnosis in bovine reproductive tract infections. *Advances in Veterinary Medicine*, 41, 217-239.
- Credille, B. C., Woolums, A. R., Giguere, S., Robertson, T., Overton, M. W. & Hurley, D. J. (2014). Prevalence of bacteremia in dairy cattle with acute puerperal metritis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(5), 1606-1612.
- Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (2011). CVMP assessment report Naxcel (EMA/V/C/000079/II/012) de 11 de Junho. *European Medicines Agency - EMA/404521/2011*.
- Day, M. L. & Anderson, L. H. (1998). Current concepts on the control of puberty in cattle. *Journal of Animal Science*, 76(3), 1-15.
- Davidson, P. & Stabenfeldt, G. H. (2013). Control of Ovulation and the Corpus Luteum. In B. G. Klein (Ed.), *Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology*, (5^a Ed.) (417-419). St. Louis, Missouri, EUA: Elsevier, Inc.
- De Boer, M. W., LeBlanc, S. J., Dubuc, J., Meier, S., Heuwieser, W., Arlt, S., Gilbert, R. O. & McDougall, S. (2014). Invited review: Systematic review of diagnostic tests for reproductive-tract infection and inflammation in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97(7), 3983-3999.
- Deenick, E. K., Hasbold, J. & Hodgkin, P. D. (2005). Decision criteria for resolving isotype switching conflicts by B cells. *European Journal of Immunology*, 35(10), 2949-2955.
- Deguillaume, L. (2010). *L'inflammation génitale post-partum de la vache*. Tese de doutoramento. Maisons-Alfort: L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement.

- Del Vecchio, R.P., Matsas, D. J., Fortin, S., Sponenberg, D.P. & Lewis, G.S. (1994). Spontaneous uterine infections are associated with elevated prostaglandin $F_{2\alpha}$ metabolite concentrations in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 41(2), 413-421.
- Dhaliwal, G.S., Murray, R.D. & Woldehiwet, Z. (2001). Some aspects of immunology of the bovine uterus related to treatments for endometritis. *Animal Reproduction Science*, 67(3-4), 135-152.
- Dolezel, R., Vecera, M., Palenik, T., Cech, S. & Vyskocil, M. (2008). Systematic clinical examination of early postpartum cows and treatment of puerperal metritis did not have any beneficial effect on subsequent reproductive performance. *Veterinarni Medicina*, 53(2), 59-69.
- Dolezel, R., Palenik, T., Cech, S., Kohoutova, L., Vyskocil, M. (2010). Bacterial contamination of the uterus in cows with various clinical types of metritis and endometritis and use of hydrogen peroxide for intrauterine treatment. *Veterinarni Medicina*, 55(10), 504-511.
- Donofrio, G., Ravanetti, L., Cavirani, S., Herath S., Capocefalo, A. & Sheldon I. M. (2008). Bacterial infection of endometrial stromal cells influences bovine herpesvirus-4 immediate early gene activation: A new insight into bacterial and viral interaction for uterine disease. *Reproduction*, 136(3), 361-366.
- Donofrio, G., Franceschi, V., Capocefalo, A., Cavirani, S. & Sheldon, I. M. (2009). Isolation and characterization of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) from a cow affected by post partum metritis and cloning of the genome as a bacterial artificial chromosome. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7, 83 [Online]. Acedido a 25 de Abril de 2016 em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2734843/pdf/1477-7827-7-83.pdf>.
- Douglas, G. N., Overton, T. R., Bateman II, H. G., Dann, H. M. & Drackley, J. K. (2006). Prepartal plane of nutrition, regardless of dietary energy source, affects periparturient metabolism and dry matter intake in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 89(6), 2141-2157.
- Drackley, J. K. (1999). ADSA Foundation Scholar Award. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? *Journal of Dairy Science*, 82(11), 2259-2273.
- Drillich, M., Beetz, O. Pfützner, A., Sabin, M., Sabin, H.-J., Kutzer, P., Nattermann, H. & Heuwieser, W. (2001). Evaluation of a systemic antibiotic treatment of toxic puerperal metritis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 84(9), 2010-2017.
- Drilliche, M., Pfützner, A., Sabin, H.-J., Sabin, M. & Heuwieser, W. (2003). Comparison of two protocols for the treatment of retained fetal membranes in dairy cattle. *Theriogenology*, 59(3-4), 951-960.
- Drillich, M., Arlt, S., Kerstin, S., Bergwerff, A. A., Scherpenisse, P., Heuwieser, W. (2006). Ceftiofur derivatives in serum, uterine tissues, cotyledons, and lochia after fetal membrane retention. *Journal of Dairy Science*, 89(9), 3431-3438.
- Dubuc, J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Walton, J. S. & LeBlanc, S. J. (2010). Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93(11), 5225-5233.
- Dubuc, J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Walton, J. S. & LeBlanc S. J. (2010). Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93(12), 5764-5771.
- Dubuc, J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Walton, J. S. & LeBlanc, S. J. (2011). Effects of postpartum uterine diseases on milk production and culling in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94(3), 1339-1346.

- Duffield, T. F., Rabiee, A. R. & Lean, I. J. (2008). A meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. Part 1. Metabolic effects. *Journal of Dairy Science*, 91(4), 1334-1346.
- Duffield, T. F., Rabiee, A. R. & Lean, I. J. (2008). A meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. Part 3. Health and reproduction. *Journal of Dairy Science*, 91(6), 2328-2341.
- El-Azab, M. A. Whitmore, H. L., Kakoma, I., Brodie, B. O., McKennal, D. J. & Gustafsson, B. K. (1988). Evaluation of the uterine environment in experimental and spontaneous bovine metritis. *Theriogenology*, 29(6), 1327-1334.
- Esposito, G., Irons, P. C., Webb, E. C., Chapwanya, A. (2013). Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 144(3-4), 60-71.
- Fischer, C., Drillich, M., Odau, S., Heuwieser, W., Einspanier, R. & Gabler, C. (2010). Selected pro-inflammatory factor transcripts in bovine endometrial epithelial cells are regulated during the oestrous cycle and elevated in case of subclinical or clinical endometritis. *Reproduction, Fertility and Development*, 22(5), 818-829.
- Földi, J., Kulcsár, M., Pécsi, A., Huyghe, B., de Sa, C., Lohuis, J. A. C. M., Cox, P. & Huszenicza, Gy. (2006). Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle. *Animal Reproduction Science*, 96(3-4), 265-281.
- Foster, R. A. (2009). Sistema Reprodutivo da fêmea. In J. F. Zachary & M. D. McGavin (Eds.), *Bases de Patologia em Veterinária* (4ª ed.) (1263-1315) Rio de Janeiro, Brasil: Elsevier Ltd.
- Fourichon, C., Seegers, H., Bareille, N. & Beaudeau, F. (1999). Effects of disease on milk production in the dairy cow: A review. *Preventive Veterinary Medicine*, 41(1), 1-35.
- Fourichon, C., Seegers, H. & Malher, X. (2000). Effect of disease on reproduction in the dairy cow: A meta-analysis. *Theriogenology*, 53(9), 1729-1759.
- Frazier, K., Pence, M., Mauel, M. J., Liggett, A., Hines II, M. E., Sangster, L., Lehmkuhl, H. D., Miller, D., Styer, E., West, J., Baldwin, C. A. (2001). Endometritis in postparturient cattle associated with bovine herpesvirus-4 infection: 15 cases. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13(6), 502-508.
- Galvão, K. N., Santos, N. R., Galvão, J. S. & Gilbert, R. O. (2011). Association between endometritis and endometrial cytokine expression in postpartum Holstein cows. *Theriogenology*, 76(2), 290-209.
- Galvão, K. N., Risco, C. & Santos, J. E.P. (2011). Identifying and treating uterine disease in dairy cows. *Proceedings 47th Florida Dairy Production Conference*, Gainesville, 30 de Março de 2011.
- Galvão, K.N. (2013). Uterine diseases in dairy cows: Understanding the causes and seeking solutions. *Animal Reproduction*, 10(3), 228-238.
- Gilbert, R. O. & Schwark, W. S. (1992). Pharmacologic considerations in the management of peripartum conditions in the cow. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 8(1), 29-56.
- Gilbert, R. O., Shin, S. T., Guard, C. L., Erb, H. N. & Frajblat, M. (2005). Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology*, 64(9), 1879-1888.
- Gilbert, R. O. (2013). Postpartum uterine infection and impacts on herd fertility. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 37(2), 198-199.

- Giuliodori, M. J., Magnasco, R. P., Becu-Villalobos, D., Lacau-Mengido, I. M., Risco, C. A. (2013). Metritis in dairy cows: Risk factors and reproductive performance. *Journal of Dairy Science*, 96(6), 3621-3631.
- Goff, J. P. & Stabel, J. R. (1990). Decreased plasma retinol, α -tocopherol, and zinc concentration during the periparturient period: Effect of milk fever. *Journal of Dairy Science*, 73(11), 3195-3199.
- Goff, J. P. & Horst, R. L. (1997). Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *Journal of Dairy Science*, 80(7), 1260-1268.
- Goshen, T. & Shpigel, N. Y. (2006). Evaluation of intrauterine antibiotic treatment of clinical metritis and retained fetal membranes in dairy cows. *Theriogenology*, 66(9), 2210-2218.
- Gottshall, S. L. & Hansen, P. J. (1992). Regulation of leucocyte subpopulations in the sheep endometrium by progesterone. *Immunology*, 76(4), 636-641.
- Green, M. P., Ledgard, A. M., Berg, M. C., Peterson, A. J. & Back, P. J. (2009). Prevalence and identification of systemic markers of sub-clinical endometritis in postpartum dairy cows. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 69, 37-42.
- Gröhn, Y. T., Erb, H. N., McCulloch, C. E. & Saloniemi, H. S. (1989). Epidemiology of metabolic disorders in dairy cattle: Association among host characteristics, disease, and production. *Journal of Dairy Science*, 72(7), 1876-1885.
- Gutierrez, C. G., Gong, J. G., Bramley, T. A. & Webb R. (2006). Selection on predicted breeding value for milk production delays ovulation independently of changes in follicular development, milk production and body weight. *Animal Reproduction Science*, 95(3-4), 193-205.
- Hammon, D. S., Evjen, I. M., Dhiman, T. R., Goff, J. P., Walters, J. L. (2006). Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 113(1-2), 21-9.
- Herath, S., Lilly, S.T., Fischer, D. P., Williams, E. J. Dobson, H., Bryant, C. E. & Sheldon, I. M. (2011). Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin F_{2 α} to prostaglandin E₂ in bovine endometrium. *Endocrinology*, 150(4), 1912-1920.
- Herd, T. H. (2000). Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 16(2), 215-230.
- Hill, J. & Gilbert, R. (2008). Reduced quality of bovine embryos cultured in media conditioned by exposure to an inflamed endometrium. *Australian Veterinary Journal*, 86(8), 312-316.
- Hillman, R. & Gilbert, R. O (2008). Reproductive diseases. In S. F. Peek, & T. J. Diversm (Eds.), *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle*, (2nd Ed.) (395-446). St. Louis, Missouri, EUA: Elsevier, Inc.
- Hoedemaker, M., Lund, L. A. & Wagner, W. C. (1992). Influence of arachidonic acid metabolites and steroids on function of bovine polymorphonuclear neutrophils. *American Journal of Veterinary Research*, 53(9), 1534-1539.
- Huffman, E. M., Mortimer, R., Olson, J. D., Ball, L. & Farin, P.W. (1984). Risk factors for prebreeding pyometra on four colorado dairy farms. *Preventive Veterinary Medicine*, 2(6), 785-790.

- Hunt, J. S., Miller, L., Roby, K. F., Huang, J., Platt, J. S., DeBrot, B. L. (1997). Female steroid hormones regulate production of pro-inflammatory molecules in uterine leukocytes. *Journal of Reproductive Immunology*, 35(2), 87-99.
- Hussain, A. M. & Daniel, R. C. W. (1991). Bovine normal and abnormal reproductive and endocrine functions during the postpartum period: A review. *Reproduction of Domestic Animals*, 26(3), 101-111.
- Hussain, A. M. & Daniel, R. C. W. (1991). Bovine endometritis: Current and future alternative therapy. *Zentralbl Veterinarmed A*, 38(9), 641-651.
- Huszeniczal, G., Fodor, M., Gacs, M., Kulcsar, M., Dohmen, M. J. W., Vamos, M., Porkolab, L., Kegl, T., Bartyik, J., Lohuis, J. A. C. M., Janosi, S. & Szita, G. (1999). Uterine bacteriology, resumption of cyclic ovarian activity and fertility in postpartum cows kept in large-scale dairy herds. *Reproduction Domestic Animals*, 34(3-4), 237-245.
- Ito, A., Imada, K., Sato, T., Kubo, T., Matsushima, K. & Mori, Y. (1994). Suppression of interleukin 8 production by progesterone in rabbit uterine cervix. *Biochemical Journal*, 301(Pt 1), 183-186.
- Jornal Oficial das Comunidades Europeias (1981). Directiva do conselho de 31 de Julho de 1981 relativa à interdição de certas substâncias de efeito hormonal e de substâncias de efeito tireostático - 81/602/CEE. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, 3, 38-39.
- Kadzere, C. T., Murphy, M. R., Silanikove, N. & Maltz, E. (2002). Heat stress in lactating dairy cows: A review. *Livestock Production Science*, 77(59-91).
- Kamgarpour, R., Daniel, R. C. W., Fenwick, D. C., Mcguigan, K. & Murphy, G. (1999). Post partum subclinical hypocalcaemia and effects on ovarian function and uterine involution in a dairy herd. *The Veterinary Journal*, 158(1), 59-67.
- Kaneene, J.B. & Miller, R. (1995). Risk factors for metritis in Michigan dairy cattle using herd- and cow-based modelling approaches. *Preventive Veterinary Medicine*, 23, 183-200.
- Karsch, F. J., Battaglia, D. F., Breen, K. M., Debus, N. & Harris, T. G. (2002). Mechanisms for ovarian cycle disruption by immune/inflammatory stress. *Stress*, 5(2), 101-12.
- Kasimanickam, R., Duffield, T. F., Foster, R. A., Gartley, C. J., Leslie, K. E., Walton & J. S., Johnson, W. H. (2004). Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 62(1-2), 9-23.
- Kelly, R. W., King, A. E. & Critchley, H. O. D. (2001). Cytokine control in human endometrium. *Reproduction*, 121(1), 3-19.
- Kelley, K. W., Johnson, R. W., Dantzer, R. (1994). Immunology discovers physiology. *Veterinary Immunol Immunopathology*, 43(1-3), 157-165.
- Kim, I.-H. & Suh, G.-H. (2003). Effect of the amount of body condition loss from the dry to near calving periods on the subsequent body condition change, occurrence of postpartum diseases, metabolic parameters and reproductive performance in Holstein dairy cows. *Theriogenology*, 60(8), 1445-1456.

- Knapp, J. R., Freetly, H. C., Reis, B. L., Calvert C. C. & Baldwin, R. L. (1992). Effects of somatotropin and substrates on patterns of liver metabolism in lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 75(4), 1025-1035.
- Koch, G. M. S. (2013). *Incidência e consequências da hipocalcemia subclínica no pós-parto de vacas leiteiras*. Dissertação de mestrado. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária/UTL.
- Kuhn, M. J. & Hopkins, S. M. (1983). A clinical review of bovine ureaplasmosis. *Iowa State University Veterinarian*, 45(1), 20-24.
- Kulcsár, M., Katai, L., Balogh, O., Pécsi, A., Dalevaud, C., Földi, J., Hirvonen, J., Faigl, V., Chilliard, Y, Huszenicza, Gy. (2005): Metabolic and endocrine changes, inflammatory proteins and ovarian activity in dairy cows with acute puerperal metritis. *Reproduction in Domestic Animals*, 40(4), 407.
- Lamming, G. E., Darwash, A. O. (1998). The use of milk progesterone profiles to characterise components of subfertility in milked dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 52(3), 175-190.
- Leslie, K.E., LeBlanc, S. J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Bateman, K. G., Keefe, G. P., Walton, J. S. & Johnson W. H. (2002). Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 85(9), 2223-2236.
- LeBlanc, S. J. (2008). Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: A review. *The Veterinary Journal*, 176(1), 102-114.
- LeBlanc, S. J. (2014). Reproductive tract inflammatory disease in postpartum dairy cows. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, 8(1), 54-63.
- LeBlanc, S. J., Lissemore, K. D., Kelton, D. F. & Duffield, T. F. (2006). Major Advances in Disease Prevention in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 89(6), 1267-1279.
- LeBlanc, S. J., Osawa, T. & Dubuc J. (2011). Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 76(9), 1610-1618.
- Lee, N.-H., Lee, J.-A., Park, S.-Y., Song, C.-S., Choi, I.-S. & Lee, J.-B. (2012). A review of vaccine development and research for industry animals in Korea. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 1(1), 18-34.
- Leo, O., Cunningham, A. & Stern, P. L. (2011). Vaccine immunology. *Perspectives in Vaccinology*, 1(1), 25-59.
- Lessard, M., Gagnon, N., Godson, D. L. & Petit, H. V. (2004). Influence of parturition and diets enriched in n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids on immune response of dairy cows during the transition period. *Journal of Dairy Science*, 87(7), 2197-2210.
- Lewis, G. S. (1997). Symposium: Health problems of the postpartum cow. Uterine health and disorders. *Journal of Dairy Science*, 80(5), 984-994.
- Lewis, G. S. (2004). Steroidal regulation of uterine immune defenses. *Animal Reproduction Science*, 82-83, 281-294.
- Liljeqvist, S., Ståhl, S. (1999). Production of recombinant subunit vaccines: Protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. *Journal of Biotechnology*, 73(1), 1-33.

- Lima, F. S., Sá Filho, M. F., Greco, L. F., Santos J.E.P. (2012). Effects of feeding rumen-protected choline on incidence of diseases and reproduction of dairy cows. *The Veterinary Journal*, 193(1), 140-145.
- Lima, F. S., Vieira-Neto, A., Vasconcellos, G. S. F. M., Mingoti, R. D., Karakaya, E., Solé, E., Bisinotto, R. S., Martinez, N., Risco, C. A., Galvão, K. N. & Santos, J. E. P. (2014). Efficacy of ampicillin trihydrate or ceftiofur hydrochloride for treatment of metritis and subsequent fertility in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97(9), 5401-5414.
- Lindell, J. O., Kindahl, H., Jansson, L. & Edqvist, L. E. (1982). Post-partum release of prostaglandin F2 α and uterine involution in the cow. *Theriogenology*, 17(3), 237-245.
- Llewellyn, S., Fitzpatrick, R., Kenny, D. A., Patton, J., Wathes, D. C. (2008). Endometrial expression of the insulin-like growth factor system during uterine involution in the postpartum dairy cow. *Domestic Animal Endocrinology*, 34(4), 391-402.
- Lucy, M. C., Jiang, H. & Kobayashi, Y. (2001). Changes in the somatotrophic axis associated with the Initiation of Lactation. *Journal of Dairy Science*, 84, 113–119.
- Machado, V. S., Bicalho, M. L. S., Gilbert, R. O. & Bicalho, R. C. (2014). Short communication: Relationship between natural antibodies and postpartum uterine health in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97(12), 7674-8.
- Machado, V. S. & Bicalho, R. C (2015). The infectious disease epidemiologic triangle of bovine uterine diseases. *Animal Reproduction*, 12(3), 450-464.
- Machado, V. S., Bicalho, M. L. S., Meira Júnior, E. B. S., Rossi, R., Ribeiro, B. L., Lima S., Santos, T., Kussler A., Foditsch, C., Ganda, E. K., Oikonomou, G., Cheong, S. H., Gilbert, R. O. & Bicalho, R. C. (2014). Subcutaneous immunization with inactivated bacterial components and purified protein of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum* and *Trueperella pyogenes* prevents puerperal metritis in Holstein dairy cows. *Plos One*, 9(3), e91734 [Online]. Acedido a 2 de Fevereiro de 2016 em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3956715/pdf/pone.0091734.pdf>.
- Machado, V. S., Knauer, W. A., Bicalho, M. L. S., Oikonomou, G., Gilbert, R. O. & Bicalho, R. C. (2012). A novel diagnostic technique to determine uterine health of Holstein cows at 35 days postpartum. *Journal of Dairy Science*, 95(3), 1349-1357.
- Maizon, D. O., Oltenacu, P. A., Grohn, Y. T., Strawderman, R. L., Emanuelson, U. (2004). Effects of diseases on reproductive performance in Swedish Red and White dairy cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, 66(1), 113–126.
- Malinowski, E., Lassa, H., Markiewicz, H., Kaptur, M., Nadolny, M., Niewitecki, W. & Zięta, J. (2009). Sensitivity to antibiotics of *Arcanobacterium pyogenes* and *Escherichia coli* from the uteri of cows with metritis/endometritis. *Veterinary Journal*, 187(2), 234-238.
- Markusfeld, O. (1987). Periparturient traits in seven high dairy herds. Incidence rates, association with parity, and interrelationships among traits. *Journal of Dairy Science*, 70(1), 158-166.
- Martinez, N., Risco, C. A., Lima, F. S., Bisinotto, R. S., Greco, L. F., Ribeiro, E. S., Maunsell, F., Galvão, K. & Santos, J. E. P. (2012). Evaluation of periparturient calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. *Journal of Dairy Science*, 95(12), 7158-7172.

- Martinez, N., Sinedino, L. D. P., Bisinotto, R. S., Ribeiro, E. S., Gomes, G. C., Lima, F. S., Greco, L. F., Risco, C. A., Galvão, K. N., Taylor-Rodriguez, D., Driver, J. P., Thatcher, W. W. & Santos, J. E. P. (2014). Effect of induced subclinical hypocalcemia on physiological responses and neutrophil function in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97(2), 874-887.
- Mazerbourg, S., Bondy, C. A., Zhou, J. & Monget, P. (2003). The insulin-like growth factor system: A key determinant role in the growth and selection of ovarian follicles? A comparative species study. *Reproduction of Domestic Animals*, 38(4), 247-258.
- McDougall, S., Macaulay, R., Compton, C. (2007). Association between endometritis diagnosis using a novel intravaginal device and reproductive performance in dairy cattle. *Animal Reproduction Science*, 99(1-2), 9-23.
- McLaughlin, C. L., Stanisiewski, E., Lucas, M. J., Cornell, C. P., Watkins, J., Bryson, L., Tena, J. K. S., Hallberg, J. & Chenault, J. R. (2012). Evaluation of two doses of ceftiofur crystalline free acid sterile suspension for treatment of metritis in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 95, (8), 4363-4371.
- Meadows, C., Rajala-Schultz, P. J. & Frazer, G. S. (2005). A spreadsheet-based model demonstrating the nonuniform economic effects of varying reproductive performance in Ohio dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 88(3), 1244-1254.
- Meeusen, E. N. T., Walker, J., Peters, A., Pastoret, P.-P. & Jungersen, G. (2007). Current Status of Veterinary Vaccines. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3), 489-510.
- Meyer, C. L., Berger, P. J., Koehler, K. J., Thompson, J. R. & Sattler, C. G. (2001). Phenotypic trends in incidence of stillbirth for Holsteins in the United States. *Journal of Dairy Science*, 84(2), 515-523.
- Michal, J. J., Heirman, L. R., Wong, T. S., Chew, B. P., Frigg, M. & Volker, L. (1994). Modulatory effects of dietary β -carotene on blood and mammary leukocyte function in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 77(5), 1408-1421.
- Mielcarek, N., Alonso, S. & Loch, C. (2001). Nasal vaccination using live bacterial vectors. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 51(1-3), 55-69.
- Montes, M. J., Tortosa, C. G., Borja, C., Abadia, A. C., Gonzalez-Gomez, F., Ruiz, C. & Olivares, E. G. (1995). Constitutive secretion of interleukin-6 by human decidual stromal cells in culture. regulatory effect of progesterone. *American Journal of Reproductive Immunology*, 34(3), 188-194.
- Munksgaard, L. & Simonsen, H. B. (1995). Behavioral and pituitary adrenal-axis responses of dairy cows to social isolation and deprivation of lying down. *Journal of Animal Science*, 74(4), 769-778.
- Nawrotek, P., Czernomysy-Furowicz, D., Borkowski, J., Fijałkowski, K. & Pobuciewicz, A. (2012). The effect of auto-vaccination therapy on the phenotypic variation of one clonal type of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis. *Veterinary Microbiology*, 155(2-4), 434-437.
- Noakes, D. E. (2009). The puerperium. In D. E. Noakes, T. J. Parkinson & G. C. W. England (Eds.), *Veterinary Reproduction and Obstetrics*, (9th Ed.) (195-205). Edinburgh, Scotland: WB Saunders.
- Nolte, O., Morscher, J., Weiss, H.-E. & Sonntag, H.-G. (2001). Autovaccination of dairy cows to treat post partum metritis caused by *Actinomyces pyogenes*. *Vaccine*, 19(23-24), 3146-3153.

- O'Boyle, N., Corl, C. M., Gandy, J. C., Sordillo, L. M. (2009). Relationship of body condition score and oxidant stress to tumor necrosis factor expression in dairy cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 113(3-4), 297-304.
- Oliveira, T. M. (2011). *Influência da administração de cálcio no pós-parto na prevalência de doenças do puerpério em vacas de leite na ilha Terceira*. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária/UTL.
- Oliveira, M. S. R. (2011). *Performance reprodutiva, produtiva e características comportamentais de vacas Holstein-Frísia em comparação com os respectivos cruzamentos com Montbéliarde e Vermelha Sueca*. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária/UTL.
- Oltenacu, P. A., Rounsaville, T. R., Milligan, R. A. & Foote, R. H. (1981). Systems analysis for designing reproductive management programs to increase production and profit in dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 64(10), 2096-2104.
- Opsomer, G., Gröhn, Y. T., Hertl, J., Coryn, M., Deluyker, H. & de Kruif, A. (2000). Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in belgium: A field study. *Theriogenology*, 53(4), 841-857.
- Overton M, Fetrow J. (2008). Economics of Postpartum Health. In *Dairy Cattle Reproduction Council Annual Meeting*, Omaha, Nebraska, 39-43.
- Owen, J. A., Punt, J. & Stranford, S. A. (2009). Overview of the Immune System. In J. A. Owen, J. Punt & S. A. Stranford (Eds.), *Kuby Immunology* (7ª ed.) (1-25). New York, EUA: W. H. Freeman and Company.
- Padua, M. B., Tekin, S., Spencer, T. E. & Hansen, P. J. (2005). Actions of progesterone on uterine immunosuppression and endometrial gland development in the uterine gland knockout (UGKO) ewe. *Molecular Reproduction and Development*, 71(3), 347-357.
- Paisley, L. C., Mickelsen, W. D. & Anderson, P. B. (1986). Mechanisms and therapy for retained fetal membranes and uterine infections of cows: A review. *Theriogenology*, 25(3), 353-381.
- Palmer, C., (2015). Postpartum Uterine Infection. In R. M. Hopper (Ed.), *Bovine Reproduction* (440–448). Ames, Iowa, EUA: John Wiley & Sons, Inc.
- Palombi, C., Paolucci, M., Stradaoli, G., Corubolo, M., Pascolo, P. B. & Monaci, M. (2013). Evaluation of remote monitoring of parturition in dairy cattle as a new tool for calving management. *BMC Veterinary Research*, 9, 91 [Online]. Acedido a 24 de Maio de 2016 em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3850716/pdf/1746-6148-9-191.pdf>.
- Par, G., Geli, J., Kozma, N., Varga, P. & Szekeres-Bartho, J. (2003). Progesterone regulates IL12 expression in pregnancy lymphocytes by inhibiting phospholipase A2. *American Journal of Reproductive Immunology*, 49(1), 1-5.
- Parkinson, T. J. (2009). Infertility and subfertility in the cow: Structural and functional abnormalities, management deficiencies and non-specific infections. In D. E. Noakes, T. J. Parkinson & G. C. W. England (Eds.), *Veterinary Reproduction and Obstetrics*, (9ª Ed.) (393-475). Edinburgh, Scotland: WB Saunders.
- Peek, S. F. & Divers, T. J. (2008). Metabolic Diseases. In S. F. Peek, & T. J. Diversm (Eds.), *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle*, (2ª Ed.) (590-603). St. Louis, Missouri, EUA: Elsevier, Inc.

- Peter, A. T, Vos, P. L. A. M. & Ambrose, D. J. (2009). Postpartum anestrus in dairy cattle. *Theriogenology*, 71(9), 1333-1342.
- Piepenbrink, M. S. & Overton, T. R (2003). Liver metabolism and production of cows fed increasing amounts of rumen-protected choline during the periparturient period. *Journal of Dairy Science*, 86(5), 1722-1733.
- Plotkin, S. A. (2008). Vaccines: Correlates of vaccine-induced immunity. *Clinical Infectious Diseases*, 47(3), 401-409.
- Pösö, J. & Mäntysaari, E. A. (1996). Genetic relationships between reproductive disorders, operational days open and milk yield. *Livestock Production Science*, 46(1), 41-48.
- Ptaszynska, M. (2009). Reprodução em bovinos. In M. Ptaszynska (Ed.), *Compêndio de Reprodução Animal*, (10ª Ed.) (91-92). Boxmeer, Holanda: Intervet International.
- Pugh, D. G., Lowder, M. Q. & Wenzel, J. G. W. (1994). Retrospective analysis of the management of 78 cases of postpartum metritis in the cow. *Theriogenology*, 42(3), 455-463.
- Pulfer, K. W. & Riese, R. I. (1991). Treatment of Postpartum Metritis in Dairy Cows. *Iowa State University Veterinarian*, 53(1), 27-31.
- Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonard, F. C., Hartigan, P., Fanning, S. & Fitzpatrick, E. S. (2011). Pathogenic Bacteria. In P. J. Quinn, B. K. Markey, F. C. Leonard, P. Hartigan, S. Fanning & E. S. Fitzpatrick (Eds.), *Veterinary Microbiology and Microbial Disease* (2ª ed.) (177-410). Ames, Iowa, EUA: John Wiley & Sons, Inc.
- Rastani, R. R., Grummer, R. R., Bertics, S. J., Gümen, A., Wiltbank, M. C., Mashek, D. G. & Schwab, M. C. (2005). Reducing dry period length to simplify feeding transition cows: Milk production, energy balance, and metabolic profiles. *Journal of Dairy Science*, 88(3), 1004-1014.
- Regassa, F. & Noakes, D. E. (1999). Acute phase protein response of ewes and the release of PGFM in relation to uterine involution and the presence of intrauterine bacteria. *Veterinary Record*, 144(18), 502-506.
- Rhodes, F. M., McDougall, S., Burke, C. R., Verkerk, G. A. & Macmillan, K. L. (2003). Invited review: Treatment of cows with an extended postpartum anestrous interval. *Journal of Dairy Science*, 86(6), 1876-1894.
- Risco, C. A. & Hernandez, J. (2003). Comparison of ceftiofur hydrochloride and estradiol cypionate for metritis prevention and reproductive performance in dairy cows affected with retained fetal membranes. *Theriogenology*, 60(1), 47-58.
- Risco, C. A., Youngquist, R. S. & Shore, M. D. (2007). Postpartum uterine infections. In R. S. Youngquist & W. R. Threlfall (Eds.), *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*, (2ª Ed.) (339-344). St. Louis, Missouri, EUA: Elsevier, Inc.
- Roche, J. F. (2006). The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Animal Reproduction Science*, 96(3-4), 282-296.
- Roncada, P., Ermini, L., Schleuning, A., Stracciari, G. L. & Strocchia, A. (2000). Pharmacokinetics and residual behaviour in milk of oxytetracycline in cows following administration of uterine pessaries. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 23(5), 281-285.

- Ruder, C. A., Sasser, R. G., Williams, R. J., Ely, J. K., Bull, R. C. & Butler, J. E. (1981). Uterine infections in the postpartum cow. II. Possible synergistic effect of *Fusobacterium necrophorum* and *Corynebacterium pyogenes*. *Theriogenology*, 45(8), 1463-1472.
- Salmon, S. A., Watts, J. L. & Yancey Jr, R. J. (1998). In vitro activity of ceftiofur and its primary metabolite, desfuroylceftiofur, against organisms of veterinary importance. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8(3), 332-336.
- Sandals, W. C. D. & Curtis, R. A. Cote, J. F. & Martin, S. W. (1979). The effect of retained placenta and metritis complex on reproductive performance in dairy cattle - A case control study. *Canadian Veterinary Journal*, 20(5), 131-135.
- Santos, J. E. P., Rutigliano, H. M. & Sá Filho, M. F. (2009). Risk factors for resumption of postpartum estrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 110(3-4), 207-221.
- Santos, J. E. P., Bisinotto, R. S., Ribeiro, E. S., Lima, F. S., Greco, L. F., Staples, C. R. & Thatcher, W. W. (2010). Applying nutrition and physiology to improve reproduction in dairy cattle. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, 67, 387-403.
- Sartori, R., Haughian, J. M., Shaver, R. D., Rosa, G. J. M. & Wiltbank, M. C. (2004). Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 87(4), 905-920.
- Savio, J. D., Boland, M. P. & Roche, J. F. (1990). Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in post-partum dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, 88(2), 581-591.
- Scalia, D., Lacetera, N., Bernabucci, U., Demeyere, K., Duchateau, L. & Burvenich, C. (2006). In vitro effects of nonesterified fatty acids on bovine neutrophils oxidative burst and viability. *Journal of Dairy Science*, 89(1), 147-154.
- Schlafer, D. H. & Foster R. A. (2016). Female Genital System. In M. G. Maxie (Ed.), *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals*, Vol. 3, (6^a Ed) (429-564). Guelph, Ontario, Canadá, Elsevier Ltd.
- Seals, R. C., Wulster-Radcliffe, M. C. & Lewis, G. S. (2002). Modulation of the uterine response to infectious bacteria in postpartum ewes. *American Journal of Veterinary Research*, 47(1), 57-63.
- Senger, P. L. (2005). The Organization and Function of the Female Reproductive System. In P. L. Senger (Ed.), *Pathways to Pregnancy and Parturition*, (2^o Revised Ed.) (10-43). Pullman, Washington, EUA, Current Conceptions, Inc.
- Senosy, W. S., Izaike, Y. & Osawa, T. (2012). Influences of metabolic traits on subclinical endometritis at different intervals postpartum in high milking cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(4), 666-674.
- Shaver, R. D. (1997). Nutritional risk factors in the etiology of left displaced abomasum in dairy cows: A Review. *Journal of Dairy Science*, 80(10), 2449-2453.
- Sheldon, I. M., Noakes, D. E. & Dobson, H. (2000). The influence of ovarian activity and uterine involution determined by ultrasonography on subsequent reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology*, 54(3), 409-419.

- Sheldon, M., Noakes, D. E., Rycroft, A. & Dobson, H. (2001). Acute phase protein responses to uterine bacterial contamination in cattle after calving. *Veterinary Record*, 148(6), 172-175.
- Sheldon, I. M., Noakes, D. E. & Dobson, H. (2002). Effect of the regressing corpus luteum of pregnancy on ovarian folliculogenesis after parturition in cattle. *Biology of Reproduction*, 66(2), 266-271.
- Sheldon, I. M., Noakes, D. E., Rycroft, A. N., Pfeiffer, D. U. & Dobson, H. (2002). Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction*, 123(6), 837-845.
- Sheldon, I.M. & Dobson, H. (2004). Postpartum uterine health in cattle. *Animal Reproduction Science*, 82-83, 295-306.
- Sheldon, I. M., Bushnell, M., Montgomery, J. & Rycroft, A. N (2004). Minimum inhibitory concentrations of some antimicrobial drugs against bacteria causing uterine infections in cattle. *Veterinary Record*, 155(13), 383-387.
- Sheldon, I. M., Rycroft, A. N. & Zhou, C. (2004). Association between postpartum pyrexia and uterine bacterial infection in dairy cattle. *Veterinary Record*, 154(10), 289-293.
- Sheldon, I. M., Lewis, G. S., LeBlanc, S. & Gilbert R. O. (2006). Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*, 65(8), 1516-1530.
- Sheldon, I. M., Williams, E. J., Miller, A. N. M., Nash, D. M. & Herath S. (2008). Uterine diseases in cattle after parturition. *The Veterinary Journal*, 176(1), 115-121.
- Sheldon, I. M., Cronin, J., Goetze, L., Donofrio G. & Schuberth H. J. (2009). Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biology of Reproduction*, 81(6), 1025-1032.
- Sheldon, I. M., Rycroft, A. N, Dogan, B., Craven, M., Bromfield, J. J., Chandler, A., Roberts, M. H., Price, S. B., Gilbert, R. O. & Simpson, K. W. (2010). Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice. *Plos One*, 5(2):e9192 [Online]. Acedido a 15 de Maio de 2016 em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2820550/pdf/pone.0009192.pdf>.
- Sieber, M., Freeman, A. E. & Kelley, D. H (1989). Effects of body measurements and weight on calf size and calving difficulty of Holsteins. *Journal of Dairy Science*, 72(9), 2402-2410.
- Silvestre, F. T., Carvalho, T. S. M., Crawford, P. C., Santos, J. E. P., Staples, C. R., Jenkins, T. & Thatcher, W. W. (2011). Effects of differential supplementation of fatty acids during the peripartum and breeding periods of Holstein cows: II. Neutrophil fatty acids and function, and acute phase proteins. *Journal of Dairy Science*, 94(5), 2285-2301.
- Singh, J., Murray, R. D., Mshelia, G., Woldehiwet, Z. (2008). The immune status of the bovine uterus during the peripartum period. *The Veterinary Journal*, 175(3), 301-309.
- Singh, J., Sidhu, S. S., Dhaliwal, G. S., Pangaonkar, G. R., Nanda, A. S. & Grewal, A.S. (2000). Effectiveness of lipopolysaccharide as an intrauterine immunomodulator in curing bacterial endometritis in repeat breeding cross-bred cows. *Animal Reproduction Science*, 59(3-4), 159-166.

- Smith, R. D., Oltenacu, P. A., & Erb, H. N. (1988). The economics of improved reproductive performance. IRM-17. *Dairy Integrated Reproductive Management*. [Online]. Acedido a 15 de Junho de 2016 em <https://www.wvu.edu/~agexten/forglvst/Dairy/dirm17.pdf>.
- Sordillo, L. M., Contreras, G. A. & Aitken, S. L. (2009). Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. *Animal Health Research Reviews*, 10(1), 53-63.
- Sordillo, L. M. & Aitken, S. L. (2009). Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128(1-3), 104-109.
- Sordillo, L. M & Raphael, W. (2013). Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and inflammation on transition cow disorders. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 29(2), 267-278.
- Spears, J. W. & Weiss, W. P. (2008). Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *The Veterinary Journal*, 176(1), 70-76.
- Steel, D.M. & Whitehead A. S. (1994). The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunology Today*, 15(2), 81-88.
- Stephens, L. R., Slee, K. J., Poulton, P., Larcombes, M. & Kosior, E. (1986). Investigation of purulent vaginal discharge in cows, with particular reference to *Haemophilus somnus*. *Australian Veterinary Journal*, 63(6), 182-185.
- Stephens, L. R. & Slee, K. J. (1987). Metronidazole for the treatment of bovine pyometra. *Australian Veterinary Journal*, 64(11), 343-346.
- Suriyasathaporn, W., Daemen, A. J. J. M., Noordhuizen-Stassen, E. N., Dieleman, S. J., Nielen, M., Schukken, Y. H. (1999). Beta-hydroxybutyrate levels in peripheral blood and ketone bodies supplemented in culture media affect the in vitro chemotaxis of bovine leukocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 68(2-4), 177-186.
- Suthar, V. S., Canelas-Raposo, J., Deniz, A. & Heuwieser, W. (2013). Prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in european dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 96(5), 2925-2938.
- Thatcher, W. W., Bartol, F. F, Knickerbocker, J. J., Curl, J. S., Wolfenson, D., Bazer, F. W. & Roberts, R. M. (1984). Maternal recognition of pregnancy in cattle. *Journal of Dairy Science*, 67
- Tran, T. Q. L., Quessy, S., Letellier, A., Desrosiers, A. & Boulianne, M. (2010). Immune response following vaccination against *Salmonella Enteritidis* using 2 commercial bacterins in laying hens. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 74(3), 185-192.
- Wang, Y., Ametaj, B. N., Ambrose, D. J. & Gänzle, M. G. (2013). Characterisation of the bacterial microbiota of the vagina of dairy cows and isolation of pediocin-producing *Pediococcus acidilactici*. *BMC Microbiology*, 13, 19 [Online]. Acedido a 23 de Abril de 2016 em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3564792/pdf/1471-2180-13-19.pdf>.
- Weiss, H. E., Hartmann, S., Nolte, Sonntag, H. G. (2003). Autogenous vaccines for the treatment of purulent metritis in dairy cows. Resumo de poster. In *Programa científico: 5ª encontro anual da DGHM*, Dresden, 29 de Setembro a 1 de Outubro de 2003.

- Williams, C. Y., Harris, T. G., Battaglia, D. F., Viguié, C. & Karsch, F. J. (2001). Endotoxin inhibits pituitary responsiveness to gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology*, 142(5), 1915-1922.
- Williams, E. J., Fischer, D. P., Pfeiffer, D. U., England, G. C.W., Noakes, D. E., Dobson, H. & Sheldon, I. M. (2005). Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology*, 63(1), 102-117.
- Williams, E. J., Fischer, D. P., Noakes, D. E., England, G. C. W., Rycroft, A., Dobson, H., Sheldon, I. M. (2007). The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology*, 68(4), 549-559.
- Williams, E. J., Sibley, K., Miller, A. N., Lane, E. A., Fishwick, J., Nash, D. M., Herath, S., England, G. C. W., Dobson, H. & Sheldon, I. M. (2008). The effect of *Escherichia coli* lipopolysaccharide and Tumor Necrosis Factor alpha on ovarian function. *American Journal of Reproductive Immunology*, 60(5), 462-473.
- Wiltbank, M. C., Gümen, A. & Sartori, R. (2002). Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology*, 57(1), 21-52.
- Wittrock, J. M., Proudfoot, K. L., Weary, D. M. & von Keyserlingk, M. A. G. (2011). Short communication: Metritis affects milk production and cull rate of Holstein multiparous and primiparous dairy cows differently. *Journal of Dairy Science*, 94(5), 2408-2412.
- Vallat, B. (2016). Antimicrobial resistance – Global view (Comunicação oral no âmbito de *Antimicrobial resistance – Palestra e debate*), Lisboa, 17 de Junho de 2016.
- Von Krueger, X., Scherpenisse, P., Roiger, S. & Heuwieser, W. (2013). Determination of ceftiofur derivatives in serum, endometrial tissue, and lochia in puerperal dairy cows with fever or acute puerperal metritis after subcutaneous administration of ceftiofur crystalline free acid. *Journal of Dairy Science*, 96(2), 1054-1062.
- Xin, Z., Waterman, D. F., Hemken, R. W. & Harmon, R. J. (1993). Copper status and requirement during the dry period and early lactation in multiparous holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 76(9), 2711-2716.
- Yassin, A. F., Hupfer, H., Siering, C. & Schumann, P. (2011). Comparative chemotaxonomic and phylogenetic studies on the genus *Arcanobacterium* Collins et al. 1982 emend. Lehnert et al. 2006: Proposal for *Trueperella* gen. nov. and emended description of the genus *Arcanobacterium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(Pt 6), 1265-1274.
- Yavas, Y. & Walton, J. S. (2000). Postpartum acyclicity in suckled beef cows: A review. *Theriogenology*, 54(1), 25-55.
- Yavari, M., Hagkhah, M., Ahmadi, M. R., Gheisari, H. R. & Nazifi, S. (2009). Comparison of cervical and uterine cytology between different classification of postpartum endometritis and bacterial isolates in Holstein dairy cows. *International Journal of Dairy Science*, 4(1), 19-26.
- Younger, K. G. (2016). *The effects of prostaglandin F2α on reproductive performance in the postpartum dairy cow and the mechanism behind its benefits*. Dissertação de mestrado. Portland, Oregon State University.
- Zepp, F. (2010). Principles of vaccine design - Lessons from nature. *Vaccine*, 28(3), 14-24.

- Zepp, F. (2016). Principles of vaccination. In S. Thomas (Ed.), *Vaccine Design: Methods and Protocols: Volume 1: Vaccines for Human Diseases, Methods in Molecular Biology* (57-83). New York, EUA: Springer Science+Business Media.
- Zerbe, H., Schneider, N., Leibold, W., Wensing, T., Kruip, T. A. M. & Schuberth, H. J. (2000). Altered functional and immunophenotypical properties of neutrophilic granulocytes in postpartum cows associated with fatty liver. *Theriogenology*, 54(5), 771-786.

Anexos

Anexo I – Dados das primíparas que permitiram a análise estatística em formato SPSS

Nº Vaca	Vacinação	Lactações	Metrite	RP	Cetose	DAE	HC	Gemelaridade	Dificuldade de parto	Leite30	HDU
617	0	1	0	0	0	0	0	0	0	682	0
629	0	1	0	1	0	0	0	0	0	968	0
716	1	1	0	0	0	0	0	0	0		0
728	1	1	0	0	0	0	0	0	0	10	0
759	0	1	0	0	0	0	0	0	0	665	0
765	1	1	1	0	0	0	0	0	0	829	0
772	1	1	0	0	0	0	0	0	0	754	0
774	1	1	0	0	0	0	0	0	0	928	0
786	1	1	0	0	0	0	0	0	0	711	0
789	1	1	0	0	0	0	0	0	0	810	0
793	1	1	1	0	0	0	0	0	0	855	0
797	0	1	0	0	0	0	0	0	0	879	0
799	0	1	0	0	0	0	0	0	1	983	0
800	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1102	0
824	1	1	0	0	0	0	0	0	0	815	0
828	0	1	1	0	0	0	0	0	0	977	0
829	0	1	1	0	0	0	0	0	0	763	0
836	1	1	0	0	0	0	0	0	0	686	0
837	1	1	0	0	0	0	0	0	0	980	0
841	1	1	0	0	0	0	0	0	0	739	0
845	1	1	0	0	0	0	0	0	0	902	0
846	1	1	0	0	0	0	0	0	0	641	0
847	0	1	1	0	0	0	0	0	0	190	0
851	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1022	0
856	1	1	0	0	0	0	0	0	1	934	0
858	1	1	0	0	0	0	0	0	0	777	0
861	0	1	0	0	0	0	0	0	0	878	0
863	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1019	0
866	1	1	0	0	0	0	0	0	0	801	0
868	0	1	0	0	0	0	0	0	0	842	0
871	0	1	0	0	0	0	0	0	0	836	0
872	1	1	0	0	0	0	0	0	0	775	0
877	0	1	0	0	0	0	0	0	0	848	0
886	1	1	0	0	0	0	0	0	1	674	0
888	1	1	0	0	0	0	0	0	0	700	0
891	1	1	0	0	0	0	0	0	0	628	0
898	1	1	0	0	0	0	0	0	0	813	0
902	0	1	1	0	0	0	0	0	1	699	0
911	1	1	0	0	0	0	0	0	0	535	0

Anexo II – Dados das múltiparas que permitiram a análise estatística em formato SPSS

Nº Vaca	Vacinação	Lactações	Metrite	RP	Cetose	DAE	HC	Gemelaridade	Dificuldade de parto	Leite30	H DU
18	1	3	0	0	0	0	0	0	0	1002	0
19	0	3	0	0	0	0	0	0	0	876	0
26	0	3	0	0	0	0	0	1	0	985	0
45	0	3	0	0	0	0	0	0	0	1269	0
47	0	3	0	0	0	0	0	0	0	1319	0
50	1	3	0	0	0	0	0	0	0	1131	0
52	1	3	0	0	0	0	0	0	0	1142	1
56	0	3	1	0	0	0	0	0	0	822	0
61	1	3	0	0	0	0	0	0	0	1280	0
84	0	3	0	0	0	0	0	0	0	1187	0
92	1	3	0	0	0	0	0	0	0	1027	0
93	1	3	0	0	0	0	0	0	0	1403	1
96	1	3	0	0	0	0	0	0	0	704	0
138	0	4	0	0	0	0	1	0	0	878	0
147	0	5	0	0	0	0	0	0	0	1313	0
153	1	3	0	0	0	0	0	1	0	1170	0
207	1	2	0	0	0	0	0	0	0	1310	0
223	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1310	0
252	1	2	0	0	0	0	0	0	0	1217	0
280	0	2	1	0	0	0	0	0	0	1026	0
335	1	2	0	0	0	0	0	0	0	1388	1
358	1	2	0	0	0	0	0	0	0	1096	0
380	1	2	0	0	0	0	0	0	0	1547	0
400	1	2	0	0	0	0	0	0	0	1271	0
403	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1498	0
406	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1364	0
413	1	2	0	0	0	0	0	0	0	1188	0
415	1	2	0	0	0	0	0	0	0	1456	0
427	1	4	0	0	0	0	0	0	0	1285	0
428	1	4	0	0	0	0	0	0	0	1381	0
436	1	4	0	0	0	0	0	0	0	24	1
443	1	3	0	0	0	0	0	0	0		1
444	0	4	0	0	0	1	1	0	0	665	0
450	0	4	0	0	0	0	0	0	0		0
456	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1328	0
461	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1268	0
463	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1328	0
464	0	2	0	0	1	1	0	0	0	1270	0
466	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1093	0
471	0	2	0	0	0	0	0	0	1	1402	0
479	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1209	0
480	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1244	0
483	1	2	0	0	0	0	0	0	0	1373	0
491	0	2	1	0	0	1	0	0	1	1184	0
492	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1136	0
495	0	2	1	0	0	0	0	0	0	1077	0
499	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1300	0
503	1	2	0	0	0	0	0	0	0	1185	0
511	1	2	0	0	0	0	0	0	0	1060	0
515	0	2	0	0	0	0	0	0	0	906	0
549	1	2	0	0	0	0	0	0	0	1157	0
8094	1	6	0	0	0	0	0	0	0	1346	1
8321	1	6	0	0	0	0	0	0	0	1309	0
8394	1	5	0	0	0	0	0	0	0	1215	0
8404	1	5	1	0	0	0	0	0	0	483	1
8456	0	5	0	0	0	0	0	0	0	1157	0
8460	1	5	0	0	0	0	0	0	0	597	0
8480	1	5	0	0	0	0	0	0	0	1297	1
8500	1	5	0	0	0	0	0	0	0	977	1

8520	1	4	0	0	0	0	0	0	0	1193	0
8559	0	5	0	0	0	0	0	0	0	1035	0
8590	0	5	0	0	0	0	0	0	0	1040	0
8599	0	5	1	0	0	0	0	0	0	1045	1
8604	0	5	0	0	0	0	0	0	0	1381	0
8654	0	5	0	0	0	0	0	0	0	1133	0
8680	0	4	0	0	0	1	0	0	0	1080	0
8706	1	4	0	0	0	1	0	1	0	890	0
8721	1	5	0	0	0	0	0	0	0		1
8724	1	5	0	0	0	0	0	0	0	1219	1
8804	0	4	0	0	0	0	0	0	0	752	0
8871	1	4	0	0	0	0	0	0	1	1272	0
8884	1	4	0	0	0	0	0	0	0	1201	0
8885	0	4	1	0	0	0	0	0	0	942	0
8896	1	4	0	0	0	0	0	0	0	1011	0
8899	1	4	0	0	0	1	0	0	0	402	0
8902	1	4	0	1	0	0	0	0	0	1005	0
8906	0	4	0	0	0	0	0	0	0	1036	0
8923	0	4	0	0	0	0	0	0	0	1309	1
8931	1	4	0	0	0	0	0	0	0	1362	1
8953	1	4	0	0	0	0	0	0	0	1362	0
8960	1	3	0	0	0	0	0	0	1	1337	0
8982	0	4	0	0	0	0	0	0	1	834	1
8985	1	4	0	0	0	0	0	0	0	1378	1
8997	0	4	0	0	0	0	0	0	1	1237	0
8998	1	4	0	0	0	0	0	0	0	1219	0
9030	1	4	0	0	0	0	0	0	0	635	0
9031	1	4	0	0	0	0	0	0	0	1033	0
9035	1	4	0	0	0	0	0	0	0	1263	0
9055	0	3	1	1	0	0	0	0	0	1219	0
9065	1	3	0	0	0	0	0	0	0	1272	0
9080	0	3	0	0	0	0	0	0	0	792	0
9112	0	3	0	0	0	0	0	0	0	955	0
9140	0	3	0	0	0	0	0	0	1	1025	1
9181	1	3	0	0	0	0	0	0	0	1241	0
9229	0	3	0	0	0	0	0	0	0	1396	0

Anexo III

	Leite30
Significância do teste bilateral	0,373

Tabela 18 - Teste Mann-Whitney para a associação da produção leiteira aos 30 dias pós-parto (Leite30) em litros com a vacinação nas vacas multíparas.

	Leite30
Significância do teste bilateral	0,333

Tabela 19 - Teste Mann-Whitney para a associação da produção leiteira aos 30 dias pós-parto (Leite30) em litros com a vacinação nas vacas primíparas.

	Leite30
Significância do teste bilateral	0,719

Tabela 20 - Teste Mann-Whitney para a associação da produção leiteira aos 30 dias pós-parto (Leite30) em litros com a metrite nas vacas primíparas.